

DER EINFLUSS VON NIERENPHOSPHATIDEN
UND RENALEN PROSTAGLANDINEN AUF DIE
RENINREAKTIVITÄT IN VITRO

Reinhard Kohl

1977

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität
München

Direktor: Prof.Dr.E.Buchborn

DER EINFLUSS VON NIERENPHOSPHATIDEN
UND RENALEN PROSTAGLANDINEN AUF DIE
RENINREAKTIVITÄT IN VITRO

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Reinhard Kohl

aus

München

1976

mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(We 681/2)



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med.E. Held

Mitberichterstatter: Professor Dr.med.E. Buchborn

Dekan: Professor Dr.med.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25 Januar 1977

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Materialien und Methoden	8
I Renin	8
II Reninsubstratpräparation	8
III Phospholipidpräparation	8
1. Präparative Methoden	9
a. Gewinnung eines Lipidrohextraktes	9
b. Chromatographische Auftrennung der Lipide auf Kieselgelsäulen	10
c. Präparation von Lysophosphatidyl- äthanolamin	11
2. Analytische Methoden	12
a. Dünnschichtchromatographie	12
b. Phosphatbestimmung	13
IV Arachidonsäure	13
V Bestimmung der Reninaktivität	14
1. Bioassay	15
2. Radioimmunoassay	15
VI Bestimmung des Einflusses von Lipiden auf die Reninreaktivität in Abhängigkeit von ihrer Konzentration	16
1. Reaktionsansätze mit Phospholipiden	16
2. Reaktionsansätze mit Arachidonsäure	17
3. Reaktionsansätze mit Prostaglandinen	18
VII Bestimmung der Reaktionskonstanten von Renin und ihre Beeinflussung durch inhi- bierende Lipide	18
C. Ergebnisse	23
I Phosphatidpräparation	23
II Beeinflussung der Reninreaktivität durch renale Lipide	27
1. Wirkung der renalen Phospholipide	27
2. Wirkung von Arachidonsäure, PGA_2 , PGE_2 und $\text{PGF}_2\alpha$	27

III. Bestimmung der Reaktionskonstanten

K_M und V_{max} vor und nach Zugabe
inhibierender Lipide 29

1. Beeinflussung der Reaktionskonstanten
durch Lysophosphatidyläthanolamin 29

2. Beeinflussung der Reaktionskonstanten
durch PGA_2 und PGE_2 29

D. Diskussion 33

E. Zusammenfassung 40

F. Literaturverzeichnis 41

A. EINLEITUNG

Als Tigerstedt und Bergmann 1898 erstmals berichteten, daß intravenöse Injektion eines Nierenextraktes einen Blutdruckanstieg bewirkt, den sie auf eine Renin benannte Substanz zurückführten, beschrieben sie bereits, daß dieser Effekt bei nephrektomierten Tieren deutlicher ausgeprägt war und länger anhielt (101). Mit der Entdeckung eines blutdrucksteigernden Nierenhormons war so zugleich der Hinweis auf antihypertensive Eigenschaften der Niere verknüpft.

Die Rolle der Niere bei der Regulation des Blutdrucks wurde Gegenstand umfangreicher Untersuchungen, die zunächst zur weiteren Charakterisierung des Renin-Angiotensin-Systems führten: Renin wird in der Nierenrinde in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet, in intrazellulären Granula gespeichert und von dort ins Interstitium und in die Blutbahn sezerniert (25,26). Als proteolytisches Enzym spaltet es von Angiotensinogen, einem Protein der α_2 -Globulinfraktion des Plasmas, ein Dekapeptid ab, das Angiotensin I (85,96). Diese Substanz ist nicht aktiv, erst die Abspaltung weiterer zwei Aminosäuren durch das converting enzyme, das im Blut und in fast allen Körpergeweben nachweisbar ist, ergibt das biologisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II (77). Angiotensin II führt durch direkten Angriff an der glatten Gefäßmuskulatur sowie durch Erhöhung des Sympatricotonus zu einer Vasokonstriktion (27), durch Stimulation der Aldosteron- und ADH-Sekretion zu einer Steigerung der tubulären Natrium- und Wasserrückresorption (7,45). Als Summe dieser Einzeleffekte bewirkt die Aktivierung des RAS eine Salz- und Wasserretention und eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks.

Die Bedeutung dieses Systems für die Pathogenese verschiedener Hochdruckformen des Menschen ist zwar noch umstritten, doch erscheint seine Beteiligung bei der Entstehung des renalen Hochdrucks gesichert (29,30).

Daß es auch hier nicht der einzige pathogenetische Faktor ist, zeigten experimentelle Arbeiten mit verschiedenen Modellen renaler Hypertonien, in denen immer wieder nachgewiesen wurde, daß

gesundes Nierengewebe der Entwicklung eines Hochdrucks entgegenwirkt. So führte bei den Experimenten Goldblatts am Hund die Einengung einer Nierenarterie zunächst zu einer vorübergehenden Blutdruckerhöhung, die durch Konstriktion oder Entfernung der kontralateralen Niere verstärkt und dauernd aufrecht erhalten werden konnte (24).

Uninephrektomie potenzierte auch die durch NaCl-Beladung (103), durch Perinephritis (83) sowie die durch Behandlung mit DOCA (91) induzierten Hypertonien. Andererseits waren all diese Blutdrucksteigerungen ebenso wie die Hypertonie nach Binephrektomie und anschließender Kochsalzbeladung durch Einschalten einer gesunden Niere in den hypertonen Kreislauf (extrakorporal oder als Transplantat) wieder reversibel (42,66).

Muirhead und Mitarbeiter gelang es dann, den gleichen Effekt durch subcutane und intraperitoneale Implantate von Nierenmarkgewebe zu erreichen (64,67,71,72,73,74,75). Er lieferte damit den entscheidenden Hinweis auf ein antihypertensives Prinzip, das unabhängig von der exkretorischen Funktion der Niere wirkt und eher auf eine innersekretorische Leistung des Nierenmarks zurückgeführt werden muß. Die Versuche dieses inkretorische Prinzip näher zu charakterisieren, führten zur Entdeckung von zwei Substanzgruppen:

Muirhead isolierte aus Nierenmark ein Neutrallipid, das beim Goldblatthypertonus von Ratten und Kaninchen antihypertensiv wirkte. Auf Grund seiner Eigenschaften nannte er es Antihypertensives Neutrales Renomedulläres Lipid (ANRL) (69). Seine chemische Struktur - wahrscheinlich handelt es sich um ein Triglycerid - ist bisher noch nicht geklärt, ebensowenig seine physiologische Bedeutung.

Lee und Mitarbeiter extrahierten aus Nierenmarkhomogenaten drei Substanzen mit blutdrucksenkendem Effekt, die sie als Medullin, Compound 1 und Compound 2 bezeichneten (52,53,54). Diese konnten später als die renalen Prostaglandine PGA_2 , PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ identifiziert werden (14,36,49,51). Die blutdrucksenkende Wirkung dieser Substanzgruppe war schon bei ihrer Entdeckung als Bestandteil des Sekretes der Samenblase beschrieben worden (18,19).

Jetzt konnte gezeigt werden, daß Gabe von Prostaglandin E_2 und Prostaglandin A_2 die Hypertonie nach beidseitiger Nephrektomie bei Hunden sowie nach Stenosierung einer Nierenarterie und kontralateraler Nephrektomie bei Kaninchen und Ratten (68,70) verhindern konnte. Die daraufhin einsetzende Forschungsarbeit führte zu den im folgenden kurz umrissenen Erkenntnissen über Biochemie und physiologische Wirkung der renalen Prostaglandine.

Prostaglandine werden im Nierenmark, hauptsächlich in den interstitiellen Zellen der Papille gebildet (1,40,46,63,65). Unter Einwirkung eines Multienzymkomplexes, der Prostaglandin-Synthetase, entstehen aus Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, die Prostaglandine PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ (112). Arachidonsäure liegt im Gewebe kaum in freier Form, hingegen in großen Mengen an Phosphatide verestert vor (62,110). Phospholipase A_2 , die diese Esterbindung spaltet, scheint das Schlüsselenzym der PG-Synthese zu sein, da ihre Aktivität die Verfügbarkeit von freier Arachidonsäure steuert, die dann sofort durch die im Überschuß vorhandene Prostaglandin-Synthetase (21,34,43,44) weiter metabolisiert wird.

Die vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß nur PGE_2 und PGF_2 intrarenal synthetisiert werden (12,50), PGA_2 hingegen erst extrarenal durch Isomerisierung aus PGE_2 gebildet wird. Aus Nierenhomogenaten gewonnenes PGA_2 entsteht wohl erst bei der Extraktion (37). Die Prostaglandine werden nicht gespeichert, sondern sofort ins Interstitium, ins Gefäßsystem bzw. in die Tubulusflüssigkeit sezerniert (1). Ihr Abbau erfolgt intrarenal durch die in der Nierenrinde lokalisierte 15 Hydroxy-PG-Dehydrogenase (12). Im Körperkreislauf werden sie bei der Passage durch die Lunge sehr rasch zu inaktiven Derivaten metabolisiert, nur PGA_2 entgeht diesem Abbau (2,20,38,57).

In ihren biologischen Wirkungen sind sich PGE_2 und PGA_2 sehr ähnlich. Die bereits beschriebene Blutdrucksenkung beruht hauptsächlich auf einer Vasodilatation durch direkten Angriff an der glatten Gefäßmuskulatur (58), daneben scheint der inhibitorische Effekt an den adrenergen Synapsen und die daraus resultierende Hemmung der Sympatikusaktivität von Bedeutung zu sein (35). Intrarenal bewirkt PGE_2 , in geringerem Ausmaß auch PGA_2 ebenfalls eine Vasodilatation mit Zunahme der Durchblutung, vor allem der

juxtamedullären Region (39), sowie eine gesteigerte Na^+ und Wassere exkretion (58). Diese intrarenalen Effekte gewinnen besondere Bedeutung, da zumindest PGE_2 wegen seiner vollständigen Inaktivierung bei Lungenpassage kaum als zirkulierendes Hormon wirksam sein kann (20,57).

Ein anderer Forschungsansatz ging von der unterschiedlichen Reaktion normaler und nephrektomierter Tiere auf Renininjektion aus. So konnte gezeigt werden, daß der deutlichere Blutdruckanstieg nephrektomierter Tiere durch Transfusion von Blut normaler Tiere reduziert wird (84). Dieser Befund wurde durch "cross-circulation"-Experimente zwischen normalen und nephrektomierten Ratten bestätigt (28). Bei in-vitro-Versuchen fand sich, daß konstante Reninmengen im Plasma von nephrektomierten Tieren mehr Angiotensin freisetzen als im Normalplasma (8). Die Differenzen konnten nicht durch unterschiedliche Angiotensinogenkonzentrationen erklärt werden. Schließlich stellte Montague (61) bei enzymkinetischen Untersuchungen eine Aktivierung des Renins nach Nephrektomie fest. Es lag daher nahe, die Differenzen der Reninreaktivität durch unterschiedliche Mengen von Aktivatoren oder Inhibitoren zu erklären (11).

Auf der Suche nach solchen Faktoren isolierte Sen und Mitarbeiter zunächst aus Nieren (92,98), dann auch aus Plasmen (82) ein Phospholipid, das in vitro die Renin-Reninsubstrat-Reaktion inhibierte. Im Tierversuch konnten mit dieser Substanz die pressorische Antwort auf exogen injiziertes Renin (93) der Blutdruck bei renovaskulärer und DOCA-Salz-Hypertonie von Ratten (93,99) sowie die Plasmareninaktivität (94) gesenkt werden. Sowohl in vitro- (4,98,99), als auch in vivo- (3) Befunde sprachen jedoch dafür, daß der biologisch wirksame Phospholipid-Renin-Inhibitor ein Lysophosphatid ist, das erst nach Abspaltung einer Fettsäure durch Phospholipase A_2 aus dem Phosphatid, genannt Präinhibitor, entsteht.

Die referierten Befunde machen deutlich, daß in der Niere dem pressorischen, Natrium und Wasser retinierenden Renin-Angiotensin-System, eine Gruppe von Lipiden (ANRL, Prostaglandine, Phospholipide) gegenübersteht, die antagonistisch wirkt (Abb. 1). Bemerkenswert ist, daß die renalen Phospholipide die gemeinsame

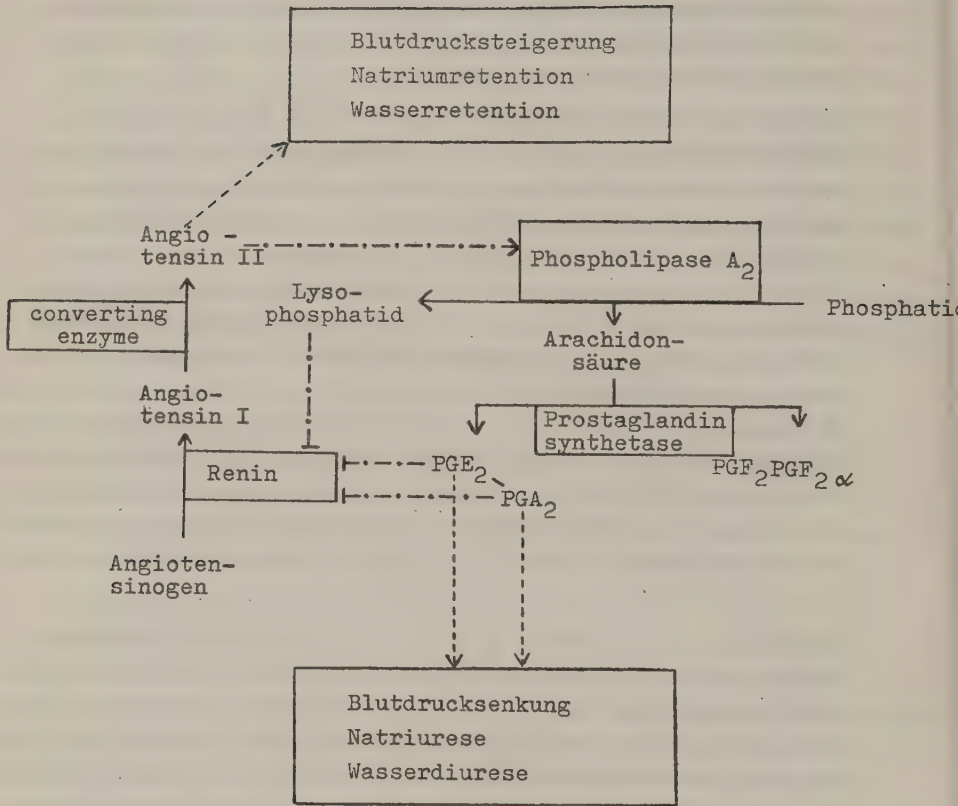


Abb. 1: Renin-Angiotensinsystem und antihypertensive Lipide:

- : Biochemische Stoffwechselwege
- : Physiologische Wirkungen
- .-.-.-.- : Möglichkeiten direkter Interaktionen zwischen beiden Systemen

Ausgangssubstanz für die Bildung sowohl der Prostaglandine als auch des Phospholipid-Renin-Inhibitors sind. Die Bedeutung der Phospholipase A_2 als Schlüsselenzym in diesem antihypertensiven "Phospholipid-Prostaglandin-System" wäre so mit der des Renin im pressorischen RAS vergleichbar.

Daß die beiden Systeme nicht nur in der Summe der Effekte als Antagonisten wirken, sondern auch in direkter Koppelung wechselseitig ihre Aktivität beeinflussen, wird durch mehrere Untersuchungsergebnisse nahegelegt.

Der Einfluß von Angiotensin II als Effektor des RAS auf die Prostaglandinsynthese erscheint gesichert. Intraarterielle Infusion von Angiotensin II führte beim Hund zu einem Anstieg prostaglandinähnlicher Substanzen im Nierenvenenblut (59). Andererseits konnte die Prostaglandinfreisetzung durch Angiotensin II-Antagonisten blockiert werden (76). Möglicherweise stimuliert Angiotensin II direkt die Phospholipase A_2 .

Umgekehrt wird die Aktivität des Renin als Schlüsselenzym des pressorischen Systems nicht nur durch Phospholipide (s.o.), sondern wohl auch durch renale Prostaglandine modifiziert. Die bisher mitgeteilten Befunde sind jedoch noch widersprüchlich. So fanden Kotchen und Miller (41) bei enzymkinetischen Untersuchungen eine deutliche Hemmung der Reaktion von menschlichem Renin mit Hammelsubstrat im Sinne einer kompetitiven Inhibierung durch PGA_1 und PGA_2 , PGE_1 zeigte geringeren, PGE_2 keinen Effekt. Die wirksamen Konzentrationen waren jedoch 2 000 bis 10 000 mal höher als die bisher angegebenen peripheren venösen Plasmaspiegel. Sambhi und Wiedman (90) berichteten, daß die Prostaglandine PGE_1 , PGE_2 und PGA_1 in niedriger Dosierung die Angiotensinbildungsrate durch menschliches Renin nicht änderten. Hingegen konnten Eggens und Mitarbeiter (17) im peripheren Plasma von Hypertonikern, Bauer (6) im Plasma von Patienten mit Nierenarterienstenose eine Aktivierung der Renin-Reninsubstrat-Reaktion durch PGE_2 in physiologischen Konzentrationen beobachten.

Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von Nierenphosphatiden und renalen Prostaglandinen (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGA_2) auf die Reninreaktivität sein. Die Untersuchungen sollten in einem homologen System (Kaninchen)

durchgeführt werden, wozu Reninsubstrat und Phospholipide aus Kaninchenplasma bzw. -nieren gewonnen werden mußten. In einem standardisierten in-vitro-Ansatz wird die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Lipide auf die Angiotensinbildungsrate gemessen. Durch Bestimmung der enzymkinetischen Reaktionskonstanten K_M und V_{max} wird der Effekt der wirksamen Lipide näher charakterisiert.

B. MATERIALIEN UND METHODEN

I Renin

In allen Versuchen wurde Kaninchenrenin der Fa. MRC, London (Charge 66/133), verwendet, das nach der Methode von Haess und Mitarbeiter (31) präpariert war. Die spezifische Aktivität dieser Präparation war nicht angegeben. Das lyophilisierte Protein einer Ampulle wurde in jeweils 1 ml aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung wurde, wie auch die noch nicht geöffneten Ampullen, bei -20°C aufbewahrt und erst vor den jeweiligen Versuchen weiter verdünnt. Alle angegebenen Verdünnungsfaktoren verstehen sich als Verdünnungen dieser Stammlösung.

II Reninsubstratpräparation

Natürliches Reninsubstrat ist ein Bestandteil der α_2 -Globulinfraktion der Serumproteine (85). Bei seiner Anreicherung sollte eine möglichst quantitative Abtrennung der übrigen Plasmaproteine sowie die Reinheit des Substrats von den Enzymen des Renin-Angiotensin-Systems (Renin, converting enzyme, Angiotensinasen) erzielt werden. Zu diesem Zweck hat sich eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat mit anschließender Sephadex-Gelfiltration als schonendes und effektives Verfahren erwiesen (13,105).

Das verwendete Reninsubstrat wurde aus dem Plasma (EDTA-Plasma) von Kaninchen gewonnen, die 24 Stunden vor dem Entbluten beidseits nephrektomiert worden waren. Nach der Nephrektomie fiel die Plasmereninaktivität auf 0 ab, die Plasmakonzentration von Reninsubstrat stieg dagegen von 810 ng/ml $\pm$ 180 SD auf 2900 ng/ml $\pm$ 270 SD an (Reninsubstratmenge ausgedrückt als maximal freisetzbare Angiotensin I nach Inkubation mit Renin im Überschuß).

Beim fraktionierten Aussalzen der Plasmasproteine mit Ammoniumsulfat fand sich der höchste Angiotensinogenanteil in den Proteinfractionen, die bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen von 220-300 g/l ausfielen. Diese Niederschläge wurden zur Abtrennung von Salzen und Verunreinigungen 48 Stunden bei 4°C gegen aqua destillata

dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Ihre spez. Angiotensinogenkonzentration betrug $170 \text{ ng} \pm 30 \text{ SD}$ pro ng Protein.

Durch die abschließende chromatographische Auftrennung über Säulen, die mit Sephadex-Gel G 75 als stationärer Phase gefüllt waren, konnte eine weitere Reinigung erzielt werden. In den Eluaten mit dem höchsten Reninsubstratgehalt betrug die durchschnittliche Angiotensinogenkonzentration 1000 ng/mg Protein. Auch diese Fraktionen wurden gegen aqua destillata dialysiert, gefriergetrocknet und so bei -20°C aufbewahrt.

III Phospholipidpräparation

1. Präparative Methoden

a.) Gewinnung eines Lipoidrohextraktes

Nieren von Bastardkeninchen, die für andere Versuche nephrektomiert wurden, wurden unmittelbar nach der Entnahme in Barbituratnarkose geteilt, vom perirenenalen Fettgewebe befreit, in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und bis zur Aufarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

Zur Herstellung eines Lipoidrohextraktes (22) wurden jeweils 5 g Nierengewebe (Feuchtgewicht) mit einem Waring-Blendor in 200 ml Chloroform p.a. - Methanol p.a./2:1 (v/v) 1 min. homogenisiert. Nach weiteren 15 min., in denen mehrmals kräftig gerührt wurde, wurde das Gemisch durch ein Faltfilter (Fa. Schleicher und Schüll) in einen Meßzylinder filtriert. Der Rückstand wurde in gleicher Weise nochmals extrahiert.

Die so gewonnene monophasische Lösung ließ sich durch Zugabe von 0,9 % NaCl-Lösung (40 ml zu 200 ml Chloroform-Methanol/2:1) in zwei deutlich voneinander getrennte Phasen zerlegen. Durch dieses Verfahren werden die in der unteren Chloroformphase gelösten Lipide von nichtlipoidalen Substanzen (Salze, Aminosäuren, Zucker) gereinigt, die sich besser in der polaren Methanol - Wasserphase lösen.

Die Methanol-Wasser-Phase wurde mit einer Wasserstrehlpumpe abgesaugt und verworfen, die Chloroformphase durch nochmaliges Ausschütteln mit Methanol und anschließende Phasentrennung

nachgereinigt. Ihr Volumen wurde mittels eines Rotationsverdampfers unter Stickstoff auf ca. 5 ml eingeengt, 1/10 des Volumens zur Bestimmung der Lipoidausbeute im Vakuum zur Trockene gebracht und auf einer Analysenwaage gewogen. Die übrigen 9 Zehntel wurden weiter aufgearbeitet.

b.) Chromatographische Auftrennung der Lipide auf Kieselgelsäulen

Zur präparativen Auftrennung eines Lipoidgemisches in seine Komponenten hat sich die Säulenchromatographie über Kieselgel als einfaches und effektives Verfahren erwiesen. Die Lipide werden an Kieselgel gebunden, hauptsächlich durch Wasserstoff-Brücken-Bindung (95) und können durch Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität dann schrittweise eluiert werden.

Das verwendete Kieselgel 60 der Fa. Merck wurde ständig bei 110°C im Trockenschrank aufbewahrt, um eine möglichst konstante Aktivität des Gels und damit reproduzierbare Elutionsmuster zu gewährleisten. Die Säulen - Glassäulen mit einer Länge von 42 cm und einem Innendurchmesser von 18 mm, unten durch einen Stopfen Glaswatte und einen Glassahn abgedichtet - wurden mit 30 g Kieselgel präpariert. Sie wurden mit Chloroform p.a. gespült, bis die Oberfläche des Säulenbettes nicht weiter sank (endgültige Säulenhöhe 25 - 27 cm). Dabei wurde die Laufgeschwindigkeit auf 1 - 2 ml/min. eingestellt. Zum Auftragen der Lipide ließ man den Lösungsmittelspiegel bis ca. 1 cm über die Säulenoberfläche absinken, brachte dann mit einer Pasteurpipette 500 mg Lipide in 2 - 3 ml Chloroform vorsichtig auf und ließ diese gänzlich in das Gel einziehen. Die einzelnen Lipoidfraktionen wurden dann nach folgendem Schema eluiert:

Elutionsschema Säule I:

Lösungsmittel:	Volumen:	Anzahl der Einzelfraktionen:
Elust 1: Chloroform	1050 ml	15
Elust 2: Chloroform-Methanol/9:1	280 ml	4
Elust 3: Chloroform-Methanol/4:1	420 ml	12
Elust 4: Chloroform-Methanol/1:1	350 ml	5

Um die angestrebte Reinderstellung von Phosphatidyläthanolamin zu erreichen, mußte dieses über eine weitere Kieselgelsäule von den übrigen in Eluat 3 erscheinenden Phosphatiden, hauptsächlich Phosphatidylserin, getrennt werden. Diese Säule (Betthöhe 15 cm, Ø 10 mm) wurde wie oben angegeben präpariert, vor dem Aufbringen der Substanz jedoch mit 5 Bettvolumen Chloroform-Methanol/4:1 (v/v), dem 1%iges konzentriertes Ammoniumhydroxid zugesetzt war, gespült. Durch diesen Ammoniumhydroxidzusatz werden die aktiven Gruppen des Kieselgels teilweise neutralisiert, die damit verbundene Änderung des Adsorptionsverhaltens ermöglicht eine Trennung der in Eluat 3 enthaltenen Lipide (89). Auf die Säule wurde eine Lipidmenge entsprechend 5 mg Lipidphosphor aufgebracht.

Elutionsschema Säule II:

Lösungsmittel:	Volumen:	Anzahl der Einzelaktionen:
Eluat 5: Chloroform-Methanol/4:1	100 ml	5
Eluat 6: Chloroform-Methanol/3:2	80 ml	4

Nach ihrer qualitativen und quantitativen Analyse wurden die Eluate 1 - 6 bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (Lösungsmittel Chloroform).

c.) Präparation von Lysophosphatidyläthanolamin

Aus Kaninchennieren isoliertes Phosphatidyläthanolamin (1,5 mg Lipidphosphor) wurde in 20 ml Diäthyläther p.a. gelöst und mit 300 µg Phospholipase A₂ (Fa. Boehringer, Mannheim) im 1 ml 1 mMol PO₄-Puffer, pH 7.0 und 200 µl 2 mMol CaCl₂-Lösung in einem Meßkolben unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer bei Zimmertemperatur inkubiert (88). Nach 36 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Methanol beendet, die Lösungsmittel wurden im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Chloroform aufgenommen und über eine Kieselgelsäule (Betthöhe 15 cm, Ø 10 mm) aufgetrennt. Zunächst sollten mit Chloroform die freien Fettsäuren, dann mit Chloroform-Methanol/1:1 (v/v) das Lysophosphatid eluiert werden.

2. Analytische Methoden

Der Verlauf der präparativen Schritte wurde qualitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, quantitativ durch Phosphoreanalysen und Wägung verfolgt.

a.) Dünnschichtchromatographie

Die qualitativen Analysen wurden als eindimensionale Trennungen auf Glasplatten, die bereits mit Kieselgel als stationärer Phase vorbeschichtet waren, durchgeführt (Fa. Merck). Als Fließmittel dienten 100 ml des Gemisches Chloroform-Methanol-7 n-Ammoniumhydroxid / 60 : 35 : 5 (v/v) (97). 1 - 2 µl der auf 500 µl eingeeengten Phosphatidfraktionen wurden ca. 15 mm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdunstet. Die Chromatogramme wurden dann in einer Trennkammer der Fa. Desaga, deren Wände zur Erhöhung der Dampfsättigung mit Filterpapier ausgekleidet waren, entwickelt. Bei Zimmertemperatur stieg die Lösungsmittelfront in einer Stunde ca. 14 cm. Die Platten wurden nun aus der Kammer genommen, an der Luft getrocknet und zum Nachweis der Lipide mit speziellen Reagentien besprüht.

Allgemeiner Lipoidnachweis:

Durch kurzes Besprühen mit 50 %iger Schwefelsäure und anschließendes Erhitzen auf 150°C (10 min.) werden alle Lipide verascht, auf den Platten bilden sich dunkelbraune Flecken auf hellem Grund.

Nachweis von Phosphatiden:

Besprüht man die Platten mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Reagenz (5 ml 60 %ige Perchlorsäure, 10 ml 1 n Salzsäure und 25 ml 4 %ige wässrige Ammoniummolybdatlösung), so ergeben Phosphatide dunkelblaue Flecken auf hellem Grund (33).

Nachweis von Phosphatiden, die freie Aminogruppen enthalten:

Diese Phosphatide werden durch Ninhydrinreagenz (0,15 g in 2,5 ml Lutidin plus 47 ml wassergesättigtes n-Butanol) spezifisch angefärbt. Nach Lufttrocknung bilden sich dunkel-violette Flecken (97).

Die einzelnen Phosphatidfraktionen wurden aufgrund ihrer R_F -Werte sowie aufgrund ihres Verhaltens bei der Anfärbung identifiziert.

b.) Phosphatbestimmung

Als Maß für den Phosphatidgehalt von Lipidlösungen wird meist die Menge des aus den Phosphatiden freisetzbaren Lipidphosphors benutzt. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, daß bereits sehr kleine Phosphatidmengen genau quantitativ bestimmt werden können, da es für den Phosphatnachweis gut reproduzierbare Mikromethoden gibt. Wir benutzten die Mikromethode von Barlett (5), bei der der Phosphatgehalt über die Bildung von Molybdato-phosphorsäure photometrisch bestimmt wird.

Ein Aliquot der in Chloroform gelösten Lipide wurde in Reagenzgläser pipettiert, die vorher mit Dichromatschwefelsäure gereinigt worden waren. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom vollständig eingedampft. Dann wurden 400 µl 72 %ige Perchlorsäure zupipettiert. Die Lipide wurden durch vorsichtiges Erhitzen über einem Bunsenbrenner so lange verascht, bis die sich anfänglich dunkel färbende Flüssigkeit wieder vollkommen klar war. Nach Zugabe von 4,2 ml aqua bidest. 0,2 ml 5 %iger Ammoniummolybdatlösung und 0,2 ml Amidolreagenz (0,5 g 2,4-Diaminophenoldihydrochlorid in 50 ml 20 %iger Natriumbisulfitlösung) wurde das Gemisch 7 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Es entstand durch Bildung von Molybdato-phosphorsäure eine stabile blaue Farbe, deren Absorption in Quarzglas-Küvetten in einem Zeissphotometer bei 830 mµ bestimmt wurde. Unter Benutzung einer Standard-Phosphat-Lösung (1,097 g KH_2PO_4 in 250 ml aqua bidest., weitere Verdünnung 1 : 50 entsprechend 2 µg Phosphat pro ml) wurde eine lineare Eichkurve (1/3/5/7 µg P) erstellt, mit deren Hilfe der Phosphatgehalt der Proben bestimmt werden konnte (Beer'sches Gesetz). Von jeder Phosphatidfraktion wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Fehlerbreite der errechneten Mittelwerte lag bei $\pm 7,3 \%$.

IV Arachidonsäure

Da Arachidonsäure als mehrfach ungesättigte Fettsäure sehr stark dem oxydativen Abbau unterliegt, werden hochangereicherte Arachidonsäure-Chargen in Form der stabileren Methylester aufbewahrt. Für unsere Zwecke mußte diese Esterbindung gespalten, die freie Arachidonsäure von ihren Degradierungsprodukten gereinigt und

anschließend in die besser wasserlösliche Na-Salzform überführt werden. Dazu wurde wie folgt verfahren (47):

100 µl Methylarachidonat in Heptan (= 10 mg; Fa. Applied Science) wurden nach Zugabe von 40 µl H_3 -Arachidonsäure (= 200 000 cpm; zur Bestimmung der Recovery) in einem Spitzglas unter Stickstoffstrom eingedampft. Dann wurden 1 ml abs. Äthanol und 0,5 ml 0,2 M NaOH zugegeben und diese Lösung 90 min. bei 37°C inkubiert (hydrolytische Esterspaltung).

Nach Ansäuern auf pH 3,0 mit konz. Ameisensäure wurden die Lipide in 2 x 2 ml Diäthyläther p.s. extrahiert. Der Äther wurde wiederum eingedampft, der Rückstand wurde in 2 x 300 µl n-Hexan aufgenommen. Über eine Kieselgelsäule, präpariert mit 0,5 g Unisil (Fa. Applied Science) in n-Hexan, wurde die Arachidonsäure gereinigt. Nach dem Aufbringen der Substanz wurden zunächst mit 20 ml n-Hexan die Degradierungsprodukte dann mit 30 ml n-Hexan mit 5 % Äther die reine Arachidonsäure eluiert. Die Reinheit der Arachidonsäure wurde dünnschichtchromatographisch getestet (Kieselgelplatten der Fa. Merck, Fließmittel: n-Hexan-Äther/95:5; Anfärbung mit Joddampf). Fraktion 2 wurde im Stickstoffstrom zur Trochene gebreht und dann in 0,2 ml abs. Alkohol gelöst. 2 x 10 µl wurden zu Toluol-Szintillationslösung pipettiert und zur Bestimmung der Recovery im Liquid Szintillations-Counter gezählt. Die Recovery schwankte zwischen 40 % und 60 %.

Zur Herstellung des Na-Salzes wurden zu der freien Arachidonsäure in Äthanol 0,1 ml 0,5 M KOH in Methanol gegeben, das Gemisch ca. 5 min. in warmen Wasser geschüttelt und im Stickstoffstrom eingedampft. Je nach der gemessenen Recovery wurden dann 1,1 - 1,7 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben, um eine Stammlösung mit 3500 µg Arachidonsäure/ml zu erhalten. In dieser Weise wurde die Arachidonsäure für jedes Experiment frisch präpariert und innerhalb von 3 Stunden verarbeitet.

V Bestimmung der Reninaktivität

Als Maß der Aktivität des Enzyms Renin bei der Umsetzung seines Substrates Angiotensinogen dient die Menge des bei dieser Reaktion gebildeten Produkts Angiotensin I. Die quantitativen Bestimmungen von Angiotensin I erfolgten in dieser Arbeit mit dem

Bioassay an der Ratte sowie mit einem Radioimmunoassay.

1. Bio-assay:

Intravenös injiziertes Angiotensin I führt bei der Ratte zu einem kurzfristigen, dosisabhängigen Blutdruckenstieg, der bei entsprechender Vorbehandlung gut reproduzierbar ist. Über eine Eichkurve mit synthetischem Angiotensin II läßt sich der Angiotensingehalt der zu testenden Proben ermitteln (105,106).

150 - 200 g schwere weibliche Wistarretten wurden durch intraperitoneale Injektion (120 mg/kg Körpergewicht) von Inaktin^R narkotisiert. Mit dem Ganglienblocker Pentoliniumtartrat (Anso-lysen^R; 5 mg/kg KG s.c.) wurden der arterielle Mitteldruck auf ca. 80 mm Hg gesenkt und störende Kreislaufreflexe ausgeschaltet. In die rechte A. carotis wurde ein Polyäthylenkatheter eingeführt und der Blutdruck über einen Statham Transducer (Modell P 23 dB) und einen Schwerzer Direktschreiber V 443 mit Verstärker GP 471 laufend registriert. Ein weiterer Katheter wurde in eine Jugularvene gelegt. Über ihn wurden die Eichlösungen (Hypertensin-Ciba; 0,25 - 4 ng) und die Aliquots der zu testenden Proben injiziert. Die Injektionsvolumina betrugen 0,005 - 0,1 ml, nach jeder Probe wurde mit 0,05 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung nachgespült.

2. Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay basiert auf der Konkurrenz zweier Antigene, nämlich Angiotensin I sowie J^{131} -Angiotensin I, das durch die Markierung mit radioaktivem Jod in seinen immunologischen Eigenschaften nicht wesentlich verändert wird, um die Bindung an einen gemeinsamen, spezifischen Antikörper. Inkubiert man deshalb konstante Mengen an Antikörper und J^{131} -Angiotensin mit Lösungen unbekannter Angiotensin I-Konzentration, so kann die Radioaktivität des durch Angiotensin I aus der Antigen-Antikörper-Bindung verdrängten J^{131} -Angiotensin I als Maß für Angiotensin I benutzt werden.

Für unsere radioimmunologischen Messungen wurde der Angiotensin I Immunotope T_M Kit der Fa. Squibb/Heyden in einer modifizierten Form verwendet. Der Antikörper zeigte keine Kreuzreaktion gegen Angiotensin II (Hypertensin-Ciba^R) in Konzentrationen bis zu

100 ng/ml oder gegen gereinigtes Reninsubstrat in Konzentrationen bis zu 4000 ng/ml (55,106). Der Reaktionssatz des Radioimmunoassays war folgendermaßen zusammengesetzt:

500 µl Pufferlösung mit J¹³¹-Angiotensin I (6000 cpm)

50 µl Angiotensin I - Antikörperlösung

10 - 50 µl der zu testenden Proben

bzw.

0 -100 µl Angiotensin I-Lösung (= 0 - 100 pg AI) für die Eichkurve

Nach einer Inkubationszeit von 18^h bei 4°C wurden 500 µl einer Lösung mit Aktivkohle zupipettiert. Innerhalb von 30 min. wurde dann der nun an die Aktivkohle adsorbierte Antigen-Antikörper-Komplex mit 3000 U/min für 10 min. abzentrifugiert, der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Messung der Radioaktivität im Rückstand erfolgte im Tracerlab, die Auswertung des Assay über ein FORTRAN-Programm auf einem Siemens 404/3 Computer. Alle Bestimmungen wurden 3fach ausgeführt. Mit Hilfe der Eichkurven war eine quantitative Auswertung im Bereich von 10 - 500 pg Angiotensin I möglich. Der Interassayvariationskoeffizient lag bei 14,2 % ± 5,6.

VI Bestimmung des Einflusses von Lipiden auf die Reninreaktivität in Abhängigkeit von ihrer Konzentration

1. Reaktionsensätze mit Phospholipiden

Um Phospholipide in wässrige Lösung zu bringen, sind Lösungsvermittler notwendig. Zu diesem Zweck wurde in den folgenden Versuchen Äthylenglycolmonomethyläther (ÄGMMÄ) benutzt (82). Jeweils 240 µg Lipidphosphor der in Chloroform aufbewahrten Phospholipidfraktionen wurden in Spitzgläser überführt, im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in 2 ml ÄGMMÄ gelöst. Diese Lösung I (120 µg Lipid-P/ml) wurde mit ÄGMMÄ weiter verdünnt zu Lösung II (24 µg Lipid-P/ml) und Lösung III (12 µg Lipid-P/ml). Getestet wurden die Säulen-Eluate 2,4,5, und 6 sowie Lysophosphatidyläthanolamin. Gemessen wurde die Angiotensinbildung nach 60minütiger Inkubation bei 37°C in folgendem Reaktionsensatz:

Kaninchenrenin (1:5) in 10 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0	30 μl
Reninsubstrat (1450 ng/ml) in 200 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0	100 μl
Phosphatid in ÄGMMÄ	30 μl
Gesamtvolumen:	160 μl =====

Endgültige Konzentrationen:

Substrat: 906 ng/ml

Phosphatidlösungen: I	22,5 μg Lipid-P/ml
II	4,5 μg " "
III	2,25 μg " "

Kontrollinkubationen wurden mit ÄGMMÄ ohne Phosphatide bzw. mit 200 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 60 min. durch Kochen (10 min.) gestoppt, der Eiweißniederschlag abzentrifugiert und der Angiotensingehalt der Proben im Bioassay an der Ratte bestimmt.

2. Reaktionsansätze mit Arachidonsäure

Die Arachidonsäurestammllösung (3,5 mg Arachidonsäure in 1 ml 0,9 %iger NaCl) wurde mit einer Lösung von 2 g NaCl in 230 ml 10 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0 (Gesamtmolarität 160 mMol) 1:43 (Lösung I), 1:251 (Lösung II), 1:1100 (Lösung III) weiterverdünn.

Inkubiert wurde in folgendem Ansatz:

Renin in 10 mMol PO_4 -Puffer (1:5)	30 μl
Reninsubstrat (1700 ng/ml) in 200 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0	100 μl
Arachidonsäurelösung	30 μl
Gesamtvolumen:	160 μl =====

Endgültige Konzentrationen:

Reninsubstrat: 1062 ng/ml

Arachidonsäure: I	15,3 ng/ml	=	$50,3 \times 10^{-6}$ Mol/l
II	2,6 ng/ml	=	$8,5 \times 10^{-6}$ Mol/l
III	0,59 ng/ml	=	$1,9 \times 10^{-6}$ Mol/l

Inkubationszeit: 60 min. bei 37°C

Kontrollinkubationen mit 200 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0.
Das gebildete Angiotensin I wurde im Radioimmunoassay bestimmt.

3. Reaktionsansätze mit Prostaglandinen

Jeweils 0,25 mg der in Äthenol gelösten Prostaglandine E_2 , A_2 und $\text{F}_{2\alpha}$ (Fa. Upjohn) wurden mit 200 mMol PO_4 -Puffer, pH 7,0 auf ein Volumen von 10 ml verdünnt. Bei einem Molekulargewicht der Prostaglandine von ca. 350 betrug die Molarität der Lösung I 71×10^{-6} Mol/l. Diese Lösung wurde mit PO_4 -Puffer noch 1 : 5 (Lösung II) und 1 : 10 (Lösung III) weiterverdünnt. Inkubiert wurde bei 60 min. bei 37°C in dem Ansatz:

Renin (1:5) in 10 mMol PO_4 -Puffer pH 7,0	30 μl
Reninsubstrat in 200 mMol PO_4 -Puffer	100 μl
Prostaglandinlösung	30 μl
Gesamtvolumen:	160 μl
	=====

Endgültige Konzentrationen

Reninsubstrat: 1060 ng/ml

Prostaglandine: I	4,7 ng/ml	$12,3 \times 10^{-6}$ Mol/l
II	0,9 ng/ml	$2,46 \times 10^{-6}$ Mol/l
III	0,46 ng/ml	$1,23 \times 10^{-6}$ Mol/l

Die Bestimmung von Angiotensin I erfolgte im Radioimmunoassay.

VII Bestimmung der Reaktionskonstanten von Renin und ihre Beeinflussung durch inhibierende Lipide

Als Maß für die biokatalytische Aktivität eines Enzyms bei der Umsetzung seines Substrates d.h. seine Affinität zum Substrat, wird allgemein die Michaelis-Konstante K_M herangezogen. Sie ist definiert als diejenige Substratkonzentration, bei der ein Enzym zur Hälfte mit Substrat gesättigt ist und bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Mit den übrigen enzymkinetischen Meßwerten, der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$ und den Reaktionsgeschwindigkeiten v bei bestimmten Substratkonzentrationen S ist K_M durch die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \quad (\text{I})$$

verbunden.

Für die Bestimmung der Parameter $V_{\max}$ und K_M aus experimentellen Meßwerten hat sich besonders der reziproke Ausdruck von Gleichung I

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + S}{V_{\max} S} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{II})$$

als hilfreich erwiesen.

Die so umgeformte Gleichung entspricht der Funktionsgleichung einer Geraden $y = ax + b$ mit den Variablen $y = \frac{1}{v}$ und $x = \frac{1}{S}$ sowie den Konstanten $a = \frac{K_M}{V_{\max}}$, dem Steigungsfaktor, und $b = \frac{1}{V_{\max}}$

Nach Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten v für verschiedene Substratkonzentrationen S bei konstanter Enzymkonzentration können die Reziprokwerte dieser Meßgrößen in ein Koordinatensystem mit der Ordinate $\frac{1}{v}$ und der Abszisse $\frac{1}{S}$, im sog. Lineweaver-Burk-Diagramm, aufgetragen werden. Die Verbindung aller Punkte $(\frac{1}{S}, \frac{1}{v})$ ergibt eine Regressionsgerade erster Art, die die x-Achse in ihrem negativen Schenkel, die y-Achse in deren positiven Schenkel schneidet. Der negative Ordinatenabschnitt entspricht $\frac{1}{K_M}$, der positive Abszissenabschnitt $\frac{1}{V_{\max}}$ (Abb. 2).

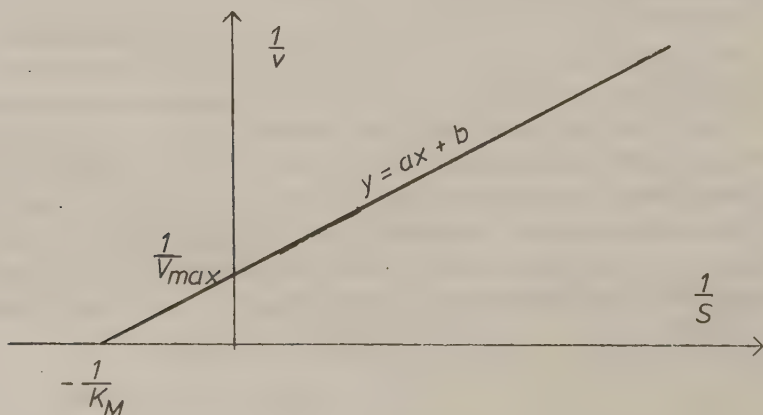


Abb. 2 :Lineweaver-Burk-Diagramm

Zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} von Keninchenrenin mußten also konstante Reninmengen mit unterschiedlicher Substratkonzentration inkubiert und die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten über das innerhalb eines definierten Zeitabschnitts gebildete Angiotensin I gemessen werden.

Aus einer Reninsubstratlösung der Konzentration 25920 ng/ml (Stufe I) wurde mit 200 mMol PO_4 -Puffer eine fortlaufende Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktoren 1 : 2 : 4 : 8 : 16 : 32 : 64; Stufen II - VII) hergestellt.

Inkubiert wurde 60 min. bei 37°C in dem Ansatz:

Reninlösung (1 : 5) in 10 mMol PO_4 ; pH 7,0	20 µl
Reninsubstratlösung (Stufe I - VII)	
200 mMol PO_4 ; pH 7,0	30 µl
PO_4 -Puffer 200 mMol, pH 7,0	70 µl
Gesamtvolumen:	120 µl
	=====

Endgültige Reninsubstratkonzentrationen:

Stufe I : 6480 ng/ml	Stufe V : 405 ng/ml
" II : 3240 " "	" VI : 202 " "
" III: 1620 " "	" VII: 102 " "
" IV : 810 " "	

Um den Einfluß derjenigen Lipide, die eine renininhibierende Wirkung gezeigt hatten, auf K_M und V_{max} zu bestimmen, erfolgte eine Modifikation dieses Reaktionsansatzes. 20 µl PO_4 -Puffer wurden durch 20 µl Lipidlösung ersetzt, und zwar:

Lysophosphatidyläthanolamin in ÄGMMÄ (120 µg P/ml)

bzw.

Prostaglandin E_2 oder Prostaglandin A_2 in PO_4 -Puffer
200 mMol; pH 7,0 ($71,25 \times 10^{-6}$ Mol/ml)

Bei einer weiteren Verdünnung von 1 : 6 im Inkubationsgemisch ergeben sich für diese Substanzen die Endkonzentrationen:

Lysophosphatidyläthanolamin : 20 µg P/ml = $0,66 \times 10^{-6}$ Mol/ml

Prostaglandin A_2 und E_2 : 4,5 µg/ml = $11,9 \times 10^{-9}$ Mol/ml

Für die Versuchsreihen mit dem Lysophosphatid wurden Kontrollinkubationen mit ÄGMMÄ durchgeführt.

Angiotensin I wurde im Rattenbioassay (Lysophosphatidyläthanolamin) bzw. im Radioimmunoassay (Prostaglandine) gemessen.

Die Reziprokwerte der so bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm gegen die Kehrwerte der Substratkonzentrationen aufgetragen und die Regressionsgeraden berechnet. Die Kehrwerte der Schnittpunkte dieser Geraden mit den Achsen des Koordinatensystems ergab denn K_M und V_{max} .

C. ERGEBNISSE

I. Phosphatidpräparation

Nach Entfernung des perirenaln Fettgewebes betrug das Feuchtgewicht der gepoolten K ninchennieren 213 g. Ein Zehntel des nachgereinigten Lipidrohextraktes wog nach Trocknung im Vakuum 463 mg, die Gesamtlipidausbeute betrug demnach 4,63 g entsprechend 2,17 g/100 g Nierengewebe.

 ber Säule I wurden in sechs Gängen insgesamt 3 g Gesamtlipide aufgetrennt.

Abbildung 3 zeigt im Dünnschichtchromatogramm die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen. Sämtliche Lipidfl chen der Fraktion 2 - 4 konnten auch mit Ammoniummolybdatreagenz gefärbt werden, die Lipide der Fraktion 1 waren mit diesem Reagenz nicht nachzuweisen. Erwartungsgemäß wurden also zunächst mit Chloroform alle phosphatfreien Lipide (Neutrallipide) mit Chloroform-Methanol dann nur Phosphatide eluiert. Eine qualitative Analyse der Neutrallipide wurde nicht durchgeführt. Die Phospholipide wurden aufgrund ihrer R_F -Werte identifiziert, Phosphatidyläthanolamin zusätzlich durch Vergleich mit einer Testsubstanz.

Quantitativ wurde der Phosphatidgehalt der Fraktionen 2 - 4 durch Phosphoranalysen bestimmt.

In Abbildung 4 ist der Verlauf einer typischen Säulentrennung dargestellt, in Tabelle 1 sind die quantitativen Ergebnisse von sechs verschiedenen Elutionen zusammengefaßt. Sie zeigt, daß der Elutionsverlauf gut reproduzierbar und der Lipidverlust über die Säule gering (10 %) war. Eine direkte Umrechnung von Phosphatgewicht in Lipidgewicht ist wegen der unterschiedlichen Molekulargewichte der Phosphatide nicht möglich.

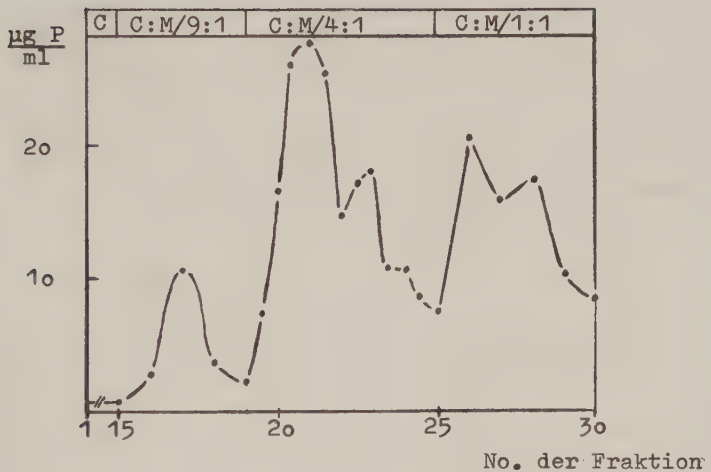


Abbildung 4: Elutionsverlauf von Säule I (phosphathaltige Fraktionen)
 Abszisse: Nummer der Fraktion(jeweils 70 ml)
 Ordinate: µg P/ml

SÄULE I	Elust 1: 0.27 mg $\pm$ 0.05 SD Elust 2: 1.38 mg $\pm$ 0.06 SD Elust 3: 6.52 mg $\pm$ 0.09 SD Elust 4: 3.96 mg $\pm$ 0.12 SD
aufgebracht: 500 mg Lipid = 13.1 mg Lipid-P	12.13 mg Lipid-P (Recovery: 92 %)
Gesamtmenge: 78.6 mg Lipid-P (6 Säulengänge)	72.78 mg Lipid-P

Tabelle 1:
 Quantitatives Ergebnis der Säulenelution I

Über das mit Ammoniumhydroxid teilweise neutralisierte Kieselgel der Säule II wurde Fraktion 3 weiter aufgetrennt (Abb. 5).

Auf dem Dünnschichtchromatogramm ist zu sehen, daß mit Chloroform : Methanol / 4 : 1 zunächst nur Phosphatidyläthanolamin, mit Chloroform : Methanol / 3 : 2 dann die übrigen Phospholipide in Eluat III eluiert wurden. Die Ausbeuten dieses Trennungsganges sind in der Tabelle 2 dokumentiert.

SÄULE II	Eluat 5: 3.21 mg $\pm$ 0.09 SD Eluat 6: 1.35 mg $\pm$ 0.19 SD
aufgebracht: 5 mg Lipid-P	4.56 mg Lipid-P (Recovery: 91 %)
Gesamtmenge: 30 mg Lipid-P (6 Säulengänge)	27.36 mg Lipid-P

Tabelle 2:

Quantitatives Ergebnis der Säulenelution II

Durch Inkubation mit Phospholipase A₂ wurde Phosphatidyläthanolamin in Lysophosphatidyläthanolamin und freie Fettsäuren gespalten. Aus Abbildung 6 erkennt man, daß diese Reaktion nach 36 Stunden unter den gewählten Inkubationsbedingungen vollständig abgelaufen war und die Reaktionsprodukte durch Säulenchromatographie über Kieselgel gut separiert werden konnten. In fünf Inkubationen wurden je 1,5 mg Lipid-Phosphor eingesetzt, nach der chromatographischen Trennung betrug die Ausbeute 1,22 mg $\pm$ 0,14 SD Lipidphosphor. Insgesamt wurde also eine Lysophosphatidyläthanolamin-Menge entsprechend 6,1 mg Lipidphosphor präpariert.



Abb. 5 :Dünnschichtchromatogramm
der Eluate von Säule II:
Eluat 5:Phosphatidyläthanolamin
Eluat 6:Phosphatidylserin,
Lysophosphatide



Abb. 6 Dünnschichtchromatogramm
von Phosphatidyläthanolamin(PE)
und den daraus nach Phospholi-
paseinkubation entstandenen Pro-
dukten, freien Fettsäuren(FS)
und Lysophosphatidyläthanolamin
(LPE).

II. Beeinflussung der Reninreaktivität durch renale Lipide

Zunächst wurde die Angiotensinbildungsrate in einem Ansatz mit konstanter Renin- und Angiotensinogenkonzentration nach Zugabe von Lipidlösungen in drei unterschiedlichen Verdünnungen gemessen.

1. Wirkung der renalen Phospholipide

Der Vergleich zwischen den Kontrollbestimmungen mit Phosphatpuffer (100 %) und dem Lösungsvermittler Äthylenglykolmonomethyläther (ÄGMMÄ) ergibt, daß dieser bereits eine Verminderung der Reninreaktivität auf 77 % bewirkt. Abbildung 7 zeigt, daß keine der aus Nierengewebe direkt gewonnenen Phosphatidfraktionen die Angiotensinbildung weiter beeinflußt. Dagegen führt das aus Nierenphosphatidyläthanolamin durch Inkubation mit Phospholipase A₂ präparierte Lysophosphatidyläthanolamin in den beiden höheren Konzentrationen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Hemmung der Renin-Reninsubstrat-Reaktion ($p < 0,01$; Wilcoxon-Test).

2. Wirkung von Arachidonsäure, PGA₂, PGE₂ und PGF_{2α}

Nach Zusatz von PGA₂ und PGE₂ zum Inkubationsgemisch ließ sich eine deutliche Inhibierung der Reninreaktivität nachweisen, die mit steigender Konzentration signifikant zunahm. Die Hemmung durch PGA₂ war ausgeprägter und bereits bei niedrigsten Dosen zu beobachten. Die Effekte durch Arachidonsäure und PGF_{2α} sind nicht signifikant. Die prozentualen Abweichungen von den Kontrollinkubationen sind in Abbildung 8 dargestellt.

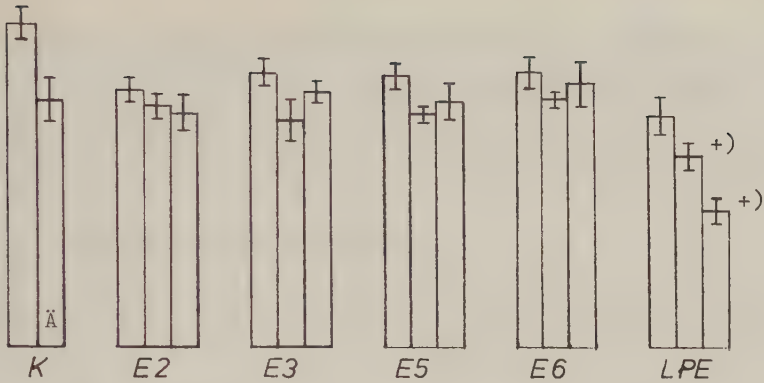


Abb. 7 : Der Einfluß von Nierenphosphatiden (Säulen-
Eluate E2, E4 bis E6) und Lysophosphatidyl-
äthanolamin (LPE) auf die Reninreaktivität

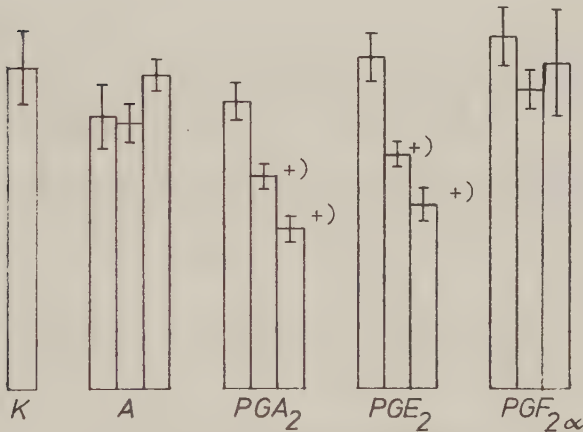


Abb. 8 : Der Einfluß von Arachidonsäure (A) und Prosta-
glandinen (PGA₂, PGE₂, PGF_{2α}) auf die Renin-
reaktivität

linke Säule: Lipidkonzentration III

rechte Säule: Lipidkonzentration I

K : Kontrollbestimmung mit PO₄-Puffer
bzw. Äthylenglykolmonomethyläther (Ä)

+) : Signifikant vom Kontrollwert ver-
schieden; $p < 0.01$

III. Bestimmung der Reaktionskonstanten K_M und V_{max} vor und nach Zugabe inhibierender Lipide

In sieben verschiedenen Experimenten wurden zunächst die Reaktionskonstanten von Kaninchenrenin ohne inhibierende Lipide bestimmt.

Nach doppelt reziproker Auftragung der unterschiedlichen Substratkonzentrationen und der jeweils gemessenen Angiotensinbildungsrate im Lineweaver-Burk-Diagramm wurde mit Hilfe der Regressionsgeraden für Kaninchenrenin eine Michaelis-Menten-Konstante K_M von 1004 ng/ml $\pm$ 35 SD ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug bei der eingesetzten Reninmenge 113 ml x h $\pm$ 2 SD (Abb. 9/10).

1. Beeinflussung der Reaktionskonstanten durch Lysophosphatidyläthanolamin

Vier Kontrollinkubationen mit Äthylenglykolmonomethyläther zeigten eine Hemmung der Reninreaktivität, die durch einen Anstieg von K_M auf 1282 ng / ml $\pm$ 35 SD sowie eine Verminderung von V_{max} auf 95 ng / ml x h $\pm$ 2 SD verdeutlicht wird.

Lysophosphatidyläthanolamin führt in einer Konzentration von 0.66×10^{-3} Mol/l zu einer weiteren signifikanten Zunahme von K_M auf 1980 ng / ml $\pm$ 45 SD und einem Abfall von V_{max} auf 79 ng / ml x h $\pm$ 3 SD (n = 5).

Diese Veränderungen sind charakteristisch für eine Hemmung der Enzym-Substrat-Reaktion vom Typ der gemischten Inhibierung (Abb. 9).

2. Beeinflussung der Reaktionskonstanten durch PGA_2 und PGE_2

In jeweils fünf Experimenten, bei denen PGA_2 und PGE_2 in Phosphatpuffer zu den Inkubationsansätzen gegeben wurden, wurde gleichfalls eine signifikante Erhöhung von K_M gefunden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit blieb dagegen unbeeinflusst.

Die hier beobachteten Verschiebungen der enzymkinetischen Parameter (s. Abb. 10) sprechen für eine kompetitive Hemmung der Renin-Angiotensinogen-Reaktion.

Bei gleicher Konzentration (11.9×10^{-6} Mol/l) war der Effekt von PGA_2 ($K_M = 2694 \text{ ng / ml} \pm 313 \text{ SD}$) deutlicher ausgeprägt als der von PGE_2 ($K_M = 2222 \text{ ng / ml} \pm 156 \text{ SD}$).

In Tabelle 3 sind die Reaktionskonstanten von Keninchenrenin vor und nach Zusatz von inhibierenden Lipiden nochmals in einer Übersicht zusammengefaßt.

Substanz		K_M (ng/ml) $\pm$ SEM	$V_{\max}$ (ng/ml x h) $\pm$ SEM
Kontrolle	n = 7	1004 ± 35 (SEM)	113 ± 2
Äthylenglykol- monomethyläther	n = 4	1282 ± 32 (1)	95 ± 2 (1)
Lysophosphatidyl- äthanolamin	n = 5	1980 ± 45 (2)	75 ± 3 (2)
Prostaglandin A_2	n = 5	2694 ± 313 (1)	118 ± 3 (0)
Prostaglandin E_2	n = 5	2222 ± 156 (1)	104 ± 8 (0)

Tabelle 3:

Der Einfluß renininhibierender Lipide auf die Reaktionskonstanten von Keninchenrenin

- (0): nicht signifikant verschieden vom Kontrollwert; $p > 0.05$
 (1): signifikant verschieden vom Kontrollwert; $p < 0.01$
 (2): signifikant von Kontrolle und Äthylenglykolmonomethyl-
 äther verschieden; $p < 0.01$

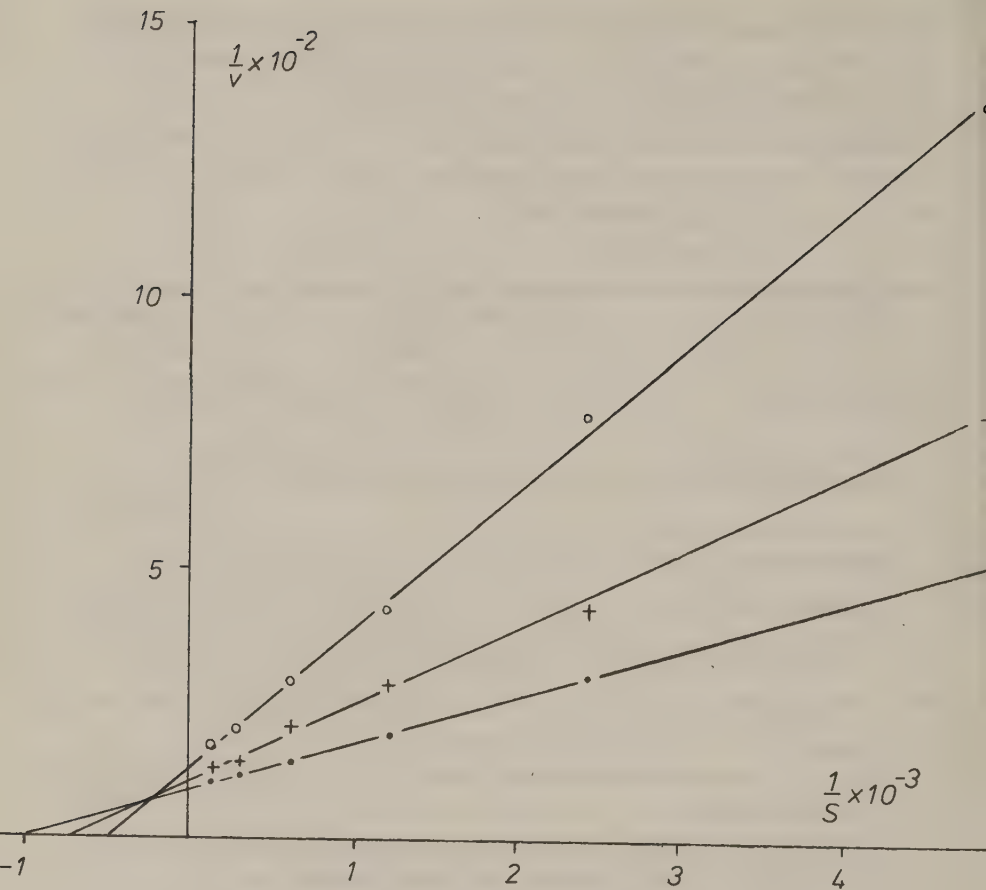


Abb. 9 : Lineweaver-Burk-Diagramm:

Das reaktionskinetische Verhalten von Kaninchenrenin vor und nach Zugabe von Lysophosphatidyl-äthanolamin

- • — • — : Kontrolle mit PO_4 -Puffer
- + — + — : Kontrolle mit Äthylenglykolmonomethyläther (ÄGMMÄ)
- ◯ — ◻ — : mit Lysophosphatidyläthanolamin in ÄGMMÄ ($0,66 \cdot 10^{-3}$ Mol/l)

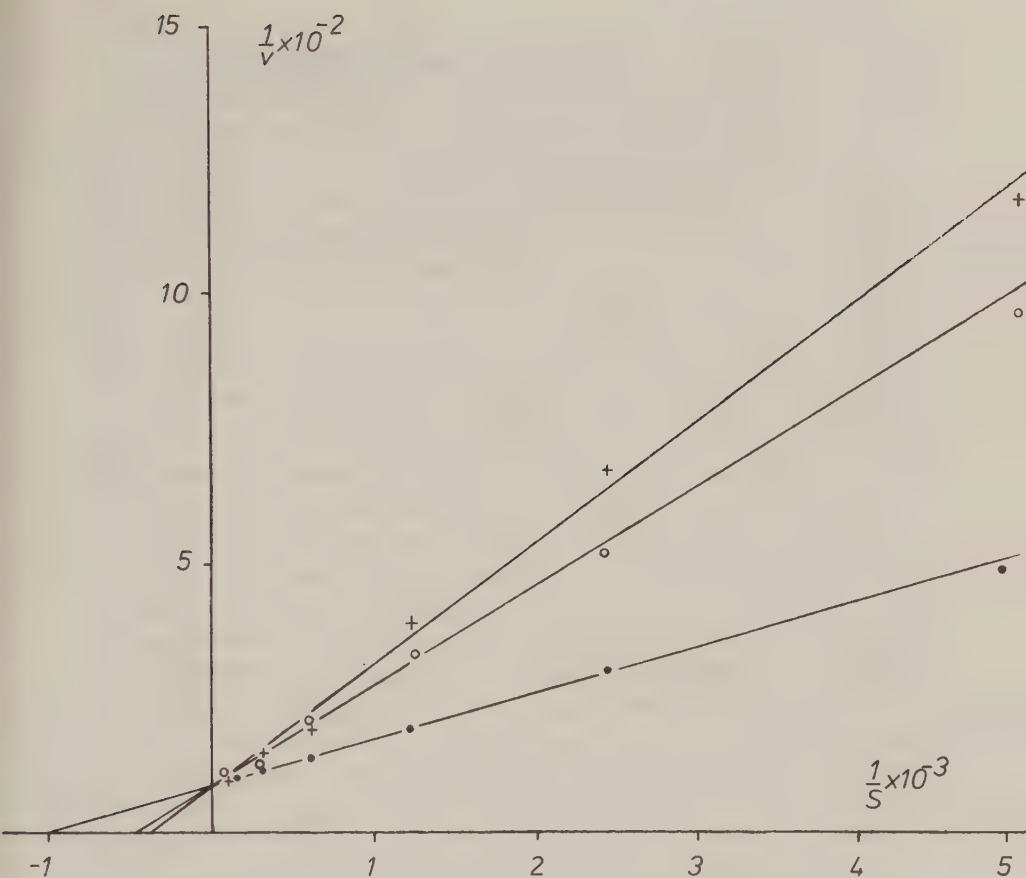


Abb. 10 : Lineweaver-Burk-Diagramm:

Das reaktionskinetische Verhalten von
Kaninchenrenin vor und nach Zugabe von
inhibierenden Prostaglandinen

- • — • — : Kontrolle mit PO_4 -Puffer
- + — + — : mit PGA_2 ($11,9 \cdot 10^{-6}$ Mol/l)
- o — o — : mit PGE_2 ($11,9 \cdot 10^{-6}$ Mol/l)

D. DISKUSSION

Um Untersuchungen an einem homologen System durchführen zu können, mußten Angiotensinogen und Phosphatide aus Kaninchenserum bzw. Kaninchennieren gewonnen werden. Das angereicherte Kaninchensubstrat zeigte eine hohe spezifische Aktivität (1000 ng/mg), eine günstige Voraussetzung für die Bestimmung der Reaktionskonstanten von Renin, da hierdurch Messungen im Bereich der Substratsättigung des Enzyms (6000 ng/ml) ermöglicht wurden.

Renin-, converting enzyme- oder Angiotensinaseaktivität, welche die Meßergebnisse verfälschen könnten, war in dieser Präparation nicht nachzuweisen (13).

Chloroform-Methanol-Extraktion und anschließende Kieselgel-Säulenchromatographie ist das gebräuchlichste Verfahren zur Gewinnung und präparativen Auftrennung von Lipidgemischen. Der Methanolzusatz führt zur Spaltung der Lipid-Proteinbindung, so daß im Gegensatz zur reinen Chloroformextraktion auch die als Lipoproteine vorliegenden Lipide vollständig extrahiert werden (95). Bei der Reinigung durch Phasentrennung können geringe Mengen saurer Lipide (z.B. Phosphatidsäuren) in die polare Phase verloren gehen (95). Andere Methoden sind jedoch langwieriger, darüber hinaus entweder ebenfalls mit Lipidverlusten verbunden (Cellulose-Säulenchromatographie (23)) oder aber die Reinigung ist nicht vollständig, wie bei den Dialysierverfahren (100).

Zur chromatographischen Auftrennung von Lipid-, insbesondere von Phosphatidgemischen wird meist Kieselgel verwendet, das leicht zu handhaben ist und ohne aufwendige Vorbereitungen gut reproduzierbare Elutionsverläufe ergibt. Nachteilig ist, daß es während der Chromatographie zu qualitativen Veränderungen der Lipide kommen kann. So neigen die in Phospholipiden gebundenen ungesättigten Fettsäuren zur Autoxidation (Bildung von Alkohol- und Ketongruppen) (89). Die Fettsäuren können jedoch auch, vor allem bei höherem Alkoholanteil im Elutionsmittel, unter Bildung von Fettsäure-Alkohol-Estern und Lyso-phosphatiden, ganz abgespalten werden (10). Beide Reaktionen scheinen durch Kieselgel begünstigt zu werden.

Ebenfalls bei hohem Methanolanteil im Elutionsmittel besteht die Gefahr, daß Kieselgel in Lösung geht und miteluiert wird (32). Dies wirft vor allem Probleme der quantitativen Auswertung auf, denn nicht nur bei Wägungen, sondern auch bei der photometrischen Phosphatbestimmung entstehen Meßfehler, da Kieselgel die Bildung von Molybdänblau bis zu 20 % unterdrücken kann (16). Wir führten deshalb in den Eluatn mit dem jeweils höchsten Methanolanteil Kontrollmessungen mit Aliquots, die vorher mit Methanol p.a. 1 : 4 verdünnt wurden, durch. Die identischen Ergebnisse mechten Meßfehler durch eluiertes Kieselgel unwahrscheinlich.

Um die enzymkinetischen Parameter K_M und V_{max} nach Lineweaver-Burk berechnen zu können, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

Der Substratverbrauch während der Inkubationsperiode sollte unter 20 % liegen, da nur so gesichert ist, daß im linearen Bereich der zeitlichen Kinetik die initiale Reaktionsgeschwindigkeit erfaßt wird (87).

Eine Häufung von Meßpunkten nahe der Ordinate des Lineweaver-Burk-Diagramms sollte durch geeignete Wahl der Substratkonzentrationen, etwa durch eine Verdünnungsreihe 1 : 2 : 4 : 8 usw. vermieden werden (15).

Unsere Versuchsanordnung trug beiden Bedingungen Rechnung. Das quantitative Ergebnis der Extraktion (2,17 g Lipid/100 g Feuchtgewicht) stimmt überein mit der Mitteilung von Morgan et al. (62), die im Cortex von Kaninchennieren 3,32 g/100 g, in der Medulla 2,08 g Lipid/100 g Feuchtgewicht fanden. Sowohl der Elutionsverlauf (102) als auch die Ausbeute an Phosphatidyläthanolamin (62,102) entsprechen den bisher mitgeteilten, nach gleichen Methoden gewonnenen Befunde.

Die Befunde über den Einfluß von Phospholipiden auf die Reninreaktivität können in zwei Aussagen zusammengefaßt werden:

1. Lysophosphatidyläthanolamin (LPE; ca. 0,1 mg/ml) hemmt die Renin-Reninsubstrat-Reaktion im Sinne einer gemischten Inhibition ("mixed type of inhibition"). Dieser Hemmungstyp wird gefunden, wenn ein Inhibitor sowohl am Enzym als auch am Substrat angreift (13), eine Möglichkeit, die für den Renininhibitor von Turcotte und Mitarbeitern (104) diskutiert wurde, ohne daß je-

doch bisher experimentelle Befunde vorlagen.

2. Die renininhibierende Wirkung scheint kein unspezifischer Effekt aller Phosphatide, sondern an die Lysophosphatidstruktur gebunden zu sein.

Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit in-vitro-Untersuchungen von Baggio und Mitarbeitern (4). Sie konnten erst nach Zugabe von Phospholipase A₂ zu einem Ansatz mit menschlichem Renin, Angiotensinogen und Phospholipid (PE; ca. 0,2 mg/ml) eine Renininhibierung beobachten. Andere Untersucher (82,99) fanden in einem System mit Hundenrenin und -substrat sowohl LPE als auch PE (1 mg/ml) aktiv. Während jedoch LPE sofort die Angiotensinbildungsrate erniedrigte, setzte dieser Effekt nach Zugabe von PE erst nach Inkubationszeiten über 60 min. ein. Man versuchte, diese zeitliche Differenz im Wirkungseintritt dadurch zu erklären, daß PE, der "Präinhibitor", im Inkubationsansatz erst in das Lysophosphatid, den "Inhibitor" umgewandelt werden müsse (4,99). Allerdings enthielt der Inkubationsansatz keine Phospholipase (82).

Der Auffassung der Strukturgebundenheit der renininhibierenden Wirkung widersprechen Befunde von Tinker et al. (102). Sie fanden bei in-vitro-Versuchen (Hundenrenin, Hundeangiotensinogen) keine Inhibierung durch LPE aus Hundenieren, dagegen war PE aktiv. Den deutlichsten Effekt zeigte jedoch Phosphatidylserin aus Ochsenhirn. Dies erscheint besonders bemerkenswert, weil in dieser Substanz nur gesättigte Fettsäuren verestert sind. Andere Autoren (82,99) halten jedoch den immer wieder bestätigten (62,109) hohen Gehalt der natürlichen Nierenphosphatide an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere an Arachidonsäure, als ausschlaggebend für die gute renininhibitorische Aktivität.

Auch Untersuchungen mit synthetischen Phosphatiden ergeben divergierende Befunde. Pfeiffer und Mitarbeiter (86) fanden bei Adamentyl-Derivaten keine Abhängigkeit des inhibierenden Effektes von der Anzahl der Fettsäure-Doppelbindungen oder von einer Lysophosphatidstruktur. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Bunag und Mitarbeiter (9). Hingegen berichtet Turcotte (104), daß synthetisches LPE (5 mg/ml) mit Arachidonsäure in der Position deutlicher wirksam war als LPE mit gesättigten Fettsäuren.

Die Prostaglandine PGA_2 und PGE_2 führten zu einer deutlichen Erhöhung von K_M , ohne signifikante Änderung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit. Dies legt nahe, daß beide als kompetitive Inhibitoren wirken.

Dieser Effekt ist wohl nicht als eine "Konkurrenz" von Substrat und Inhibitor um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms zu erklären. Er sollte eher als Ergebnis einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zwischen Enzym und Substrat verstanden werden, die für eine halbmaximale Sättigung des Enzyms höhere Substratkonzentrationen erforderlich macht. Die fehlende Hemmung nach Arachidonsäure und PGF_2 macht einen unspezifischen Effekt unwahrscheinlich. In einem in-vitro-Ansatz mit angereichertem menschlichen Renin und Hemmsubstrat untersuchten bereits Kotchen und Miller (41) den Einfluß von PGA_1 , PGA_2 , PGE_1 und PGE_2 auf die Reninreaktivität. Bei sehr hoher Konzentration ($1,4 \times 10^{-3}$ Mol/l) sahen sie einen Hemmeffekt der Prostaglandine A (PGA_1 , PGA_2), ebenfalls vom Typ der kompetitiven Inhibierung. PGE_1 war nur schwach, PGE_2 nicht aktiv. Dagegen fand Bauer (6), der zu Plasma von Patienten mit funktionell wirksamer Nierenarterienstenose PGE_2 in Konzentrationen von 10^{-7} - 10^{-5} Mol/l zusetzte, eine konzentrationsabhängige Aktivierung des nativen Plasmarenins, angezeigt durch einen Abfall der Michaelis-Menten-Konstante. Eine ähnliche Reninaktivierung durch PGE_2 konnte Eggens (17) im Plasma von Hypertonikern nachweisen.

Die diskutierten Befunde zeigen:

Die Reninreaktivität kann in-vitro durch Phosphatide und Prostaglandine beeinflußt werden; ob jedoch ein individuelles Phosphatid oder Prostaglandin einen Effekt zeigt, ob es im Sinne einer Aktivierung oder Inhibierung wirkt, und welche Konzentrationen hierfür notwendig sind, scheint von der Art des Renins (Spezies; nativ oder angereichert) und des Reninsubstrates abzuhängen.

Hier wird eine entscheidende Schwierigkeit der enzymkinetischen Untersuchungen der Renin-Reninsubstratreaktion deutlich: Weder Renin noch Reninsubstrat liegen bisher als Reinsubstanzen vor.

Deshalb zeigt auch Renin der gleichen Spezies je nach Art der Präparation deutliche Unterschiede der Enzymaktivität. Für peripheres Plasmarenin des Kaninchens wurde eine Michaelis-Menten-Konstante von $1062 \text{ ng/ml} \pm 138$ gefunden, beim gleichen Tier betrug K_M des intrarenalen Renins der juxtaglomerulären Apparate $2572 \text{ ng/ml} \pm 1156$, während für das aus Kaninchennieren nach der Methode von Haas angereicherte Renin eine K_M von 1004 ng/ml bestimmt wurde (106).

Ähnliche Verhältnisse finden sich bei menschlichem Renin (peripheres Renin: $K_M = 550 \text{ ng/ml} \pm 52 \text{ SD}$, JGA-Renin: $K_M = 300 \text{ ng/ml} \pm 85 \text{ SD}$ (6)). Die Differenzen könnten durch unterschiedliche Mengen von Aktivatoren oder Inhibitoren des Renins in den einzelnen Präparaten erklärt werden. Die gemessenen Michaelis-Menten-Konstanten sind also nicht identisch mit K_M der Renin-substanz und sollten deshalb besser "apparent K_M " bezeichnet werden (87).

Die unterschiedlichen Ergebnisse über den Einfluß von Prostaglandinen auf die Reninreaktivität - Inhibierung von angereichertem Renin, Aktivierung des "nativen" Plasmarenins - dürften ebenfalls darauf zurückzuführen sein, daß keine Reinsubstanz untersucht wurde, sondern Renin, dessen Aktivität bereits durch andere nicht näher bekannte Faktoren modifiziert ist. Da Phospholipide, wie aus unseren enzymkinetischen Untersuchungen hervorgeht, zusätzlich das Substrat angreifen, ist anzunehmen, daß die divergierenden Befunde hier auch durch die unterschiedlichen Substratpräparationen mitbedingt sind.

Unter diesen Einschränkungen sind auch die biologischen Wirkungen der renalen Lipide zu beobachten. Bei Tieren (Ratte, Hund) mit renaler Hypertonie bewirken in vitro aktive Phosphatide und Lysophosphatide nach mehrtägiger intramuskulärer Applikation einen Blutdruckabfall (93,98) und eine Erniedrigung der Plasmareninaktivität (94). Intravenöse Applikation verhinderte den Blutdruckanstieg auf Renininjektion (99). Antonello fand diese Effekte nur nach i.v.-Gabe von Lysophosphatid (3), Tinker konnte keine in-vivo-Aktivität seiner in-vitro wirksamen Substanzen feststellen (102). Bei all diesen Untersuchungen handelt es sich jedoch um pharmakologische Experimente.

Ob die Niere auch unter physiologischen Bedingungen über diesen Mechanismus eine antihypertensive Funktion ausübt, ist noch nicht klar. Nach Nephrektomie kommt es nämlich zu keinem Abfall des Blutspiegels von Phosphatidyläthanolamin, bei einigen Spezies sogar zu einem Anstieg (79,80). Die Serumkonzentration von Phospholipase A₂, die bei der Aktivierung des noch unwirksamen Lipids eine Rolle spielen könnte, bleibt konstant (78). Allerdings sprechen enzymkinetische Untersuchungen von Zechariah (111) für eine verminderte Aktivität dieses Enzyms nach Nephrektomie, ein Anhaltspunkt dafür, daß die Niere über eine Beeinflussung der PLA₂-Aktivität die Konzentration renininhibierender Lyso-phosphatide regulieren könnte.

Neben den genannten Effekten im Systemkreislauf könnte die renininhibierende Wirkung bestimmter Phosphatide intrarenal von Bedeutung sein: Renin ist in den juxtaglomerulären Apparaten in subzellulären Vesikeln gespeichert und wahrscheinlich membrangebunden. Vielfach konnte gezeigt werden, daß die Aktivität membrangebundener Enzyme durch die Phospholipidmuster der biologischen Membranen beeinflusst wird (60). Ein vermehrter Gehalt an Lysophosphatiden könnte auch die Aktivität des membrangebundenen Renins modifizieren. Experimentelle Untersuchungen zu dieser Frage liegen bisher jedoch nicht vor.

Auch für die Prostaglandine müssen intrarenale und systemische Wirkungsmechanismen diskutiert werden. Intrarenale Effekte dürften insbesondere bei Prostaglandin E₂ überwiegen, da es bei Passage durch die Lunge fast vollständig abgebaut wird. Neben dem direkten Einfluß auf die Reninreaktivität könnte das renale Prostaglandinsystem die Aktivität des RAS über eine Umverteilung des renalen Blutflusses, durch eine Änderung der tubulären Na⁺-Rückresorption sowie durch Steuerung des Renin-release aus subzellulären Strukturen moduliert werden (39,48,51,108).

Abschließend sei nochmals die Möglichkeit eines Regelkreises diskutiert, in dem das blutdrucksteigernde Renin-Angiotensin-System und die antihypertensiven Lipide direkt miteinander gekoppelt wären:

1. Angiotensin II, die wirksame Substanz des RAS, führt zu einer vermehrten Prostaglandinsynthese (59), die nach unserem bisherigen Wissen nur über eine gesteigerte Phospholipaseaktivität

möglich ist. Auch die Abnahme der Phospholipasesaktivität nach Nephrektomie (111) könnte durch fehlende Stimulation durch Angiotensin II erklärt werden.

2. Zunahme der Phospholipasesaktivität führt ihrerseits zur vermehrten Bildung von Lysophosphatiden und Prostaglandinen, die durch negatives feedback die Aktivität des RAS hemmen. Pathophysiologische Zustände, wie etwa die Hypertonie, könnten als Störung der Balance dieses Systems interpretiert werden.

Die Möglichkeit eines solchen Regelkreises wird durch die in dieser Arbeit vorgelegten in-vitro-Befunde bekräftigt, über seine physiologische Bedeutung müssen jedoch weitere experimentelle Untersuchungen, insbesondere über die Rolle der Phospholipase A_2 , Klarheit bringen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Nierenphosphatide - vor allem Lysophosphatidyläthanolamin - und renale Prostaglandine die Reninreaktivität inhibieren. Dieser Effekt könnte zumindest teilweise die antihypertensive Wirkung dieser Substanzen erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Phosphatide aus Kaninchennieren und der Prostaglandine PGE_2 , PGA_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf das enzymkinetische Verhalten von angereichertem Kaninchenrenin in vitro bestimmt.

Die Phosphatide wurden nach der Extraktion über Kieselgelsäulen chromatographisch aufgetrennt, Lysophosphatidyläthanolamin wurde durch Inkubation mit Phospholipase A_2 präpariert. Die Reninaktivität wurde im biologischen Test an der Ratte sowie in einem Radioimmunoassay gemessen.

Bestimmungen der Reninreaktivität bei halbmaximaler Substratsättigung des Enzyms ergaben, daß Lysophosphatidyläthanolamin sowie die Prostaglandine PGA_2 und PGE_2 eine konzentrationsabhängige Enzymhemmung bewirken. Die Analyse der Reaktionskinetik mit Hilfe der Parameter K_m (Michaelis-Konstante) und $V_{\max}$ (maximale Reaktionsgeschwindigkeit) legt nahe, daß Renin ($K_m = 1004 \text{ ng/ml} \pm 35 \text{ SEM}$; $V_{\max} = 113 \text{ ng/ml.h} \pm 2 \text{ SEM}$) durch Lysophosphatidyläthanolamin ($0,66 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$) im Sinne einer "gemischten Inhibierung" gehemmt wird. Der Effekt der Prostaglandine PGA_2 und PGE_2 ($11,9 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$) entsprach dagegen einer Hemmung vom kompetitiven Typ ($K_M = 2694 \text{ ng/ml} \pm 313 \text{ SEM}$, $V_{\max} = 118 \text{ ng/ml.h} \pm 3 \text{ SEM}$ für PGA_2 ; $K_m = 2222 \text{ ng/ml} \pm 156 \text{ SEM}$ und $V_{\max} = 104 \text{ ng/ml.h} \pm 8 \text{ SEM}$ für PGE_2).

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ÄNGGARD, E., S.O. BOHMAN, J.E. GRIFFIN, C. LARSSON,
A.B. MAUNSBACH
Subcellular localisation of the prostaglandin system in
the rabbit renal papilla
Acta Physiol Scand 84: 231 (1972)
- 2 ÄNGGARD, E., C. LARSSON, B. SAMUELSSON
Distribution of 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase
and prostaglandin-13-reductase in tissues of the swine
Acta Physiol Scand 81: 396 (1971)
- 3 ANTONELLO, A., B. BAGGIO, S. FAVRO, A. CORSINI, S. TODESCO,
A. BORSATTI
Effect on blood pressure of intravenous administration of
a phospholipid renin preinhibitor and its active form in
renal hypertensive rats
Pflügers Arch 341: 113 (1973)
- 4 BAGGIO, B., S. FAVRO, A. ANTONELLO, S. TODESCO, L. CAMPANACCI,
A. BORSATTI
A procedure for the determination of a renin inhibitor in
human plasma
Clinica Chimica Acta 45: 67 (1973)
- 5 BARTLETT, G.R.
Phosphorus Assay in Column Chromatography
J Biol Chem 234: 466 (1959)
- 6 BAUER, J.
Intrarenale und periphere Reninsaktivität bei Patienten mit
Nierenarterienstenose
Dissertation, Universität München (in Vorbereitung)
- 7 BIRON, P., E. KOIW, W. NOWACZYNSKI, J. BROUILLET und J. GENEST
The effects of intravenous infusions of valine⁵-angiotensin II
and other pressor agents on urinary electrolytes and cortico-
steroids, including aldosterone.
J. Clin. Invest. 40: 338 (1961)
- 8 BLAQIER, P.
Kinetic studies on renin-angiotensinogen reaction after
nephrectomy
Am J Physiol 208 (2): 1083 (1965)

- 9 BUNAG, R.D., E.J. WALASZEK
In vitro inhibition by synthetic phospholipids of pressor responses to renin
European J Pharmacol 23: 191 (1973)
- 10 CAMELJO, G.J.
Transesterification of lecithin on silicic acid columns
J. Chromatog. 21: 6 (1966)
- 11 CARRETERO, O.A., F. GROSS
Evidence for humoral factors participating in the renin-substrate reaction
Circ Res 20,21 (Suppl.II): 115 (1967)
- 12 CROWSHAW, K.
Prostaglandin biosynthesis from endogenous precursors in rabbit kidney
Nature (New Biol) 231: 240 (1971)
- 13 DAHLHEIM, H., P. WEBER, I. HEROLD und K. THURAU
Untersuchungen über präoperative Anreicherungsmöglichkeiten des Reninsubstrates (Angiotensinogen).
Pflügers Arch. 298: 131 (1967)
- 14 DANIELS, E.G., J.W. HINMAN, B.E. LEACH, E.E. MUIRHEAD
Identification of prostaglandin E₂ as the principal vasodepressor lipid of rabbit renal medulla
Nature 215: 1298 (1967)
- 15 DIXON, M., E.C. WEBB
Enzymes
London, Longmans, Green and Co. Ltd. (1964)
- 16 DOIZAKI, W.M., L. ZIEVE
Quantitative estimation of phosphatides by thin layer chromatography
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 113: 91 (1963)
- 17 EGGENA, P., J.D. BARRETT, M.P. SAMBHI
Effect of prostaglandins on the enzymatic reaction of human renin in isolated homologous system in normal and hypertensive plasma
Third meeting of the International Society of Hypertension, Maastrand (1974)

- 18 EULER, U.S.
Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes
Klinische Wochenschrift 14: 1182 (1935)
- 19 EULER, U.S.
Weitere Untersuchungen über Prostaglandin, die physiologisch aktive Substanz gewisser Genitaldrüsen
Skandinavisches Archiv für Physiologie 81: 65 (1939)
- 20 FERREIRA, S.H., J.R. VANE
Prostaglandins: Their disappearance from and release into the circulation
Nature (Lond) 216: 868 (1967)
- 21 FLOWER, R.J., G.J. BLACKWEL
Importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis
Biochem Pharm 25 (3): 285 (1976)
- 22 FOLCH, J., M. LEES, SLOANE STANLEY
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J. Biol. Chem. 226: 497 (1957)
- 23 GARCIA, M.D., J.A. LOVERN, J. OLLEY
The lipids of fish
Biochem J 62: 99 (1956)
- 24 GOLDBLATT, H., J. LYNCH, R.F. HANZAL, W.W. SUMMERVILLE
Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia
J Exp Med 59: 347 (1934)
- 25 GOORMAGHTIGH, N.
Existence of an endocrine gland in the media of the renal arterioles
Proc Soc Exp Biol Med 42: 688 (1939)
- 26 GOORMAGHTIGH, N.
Facts in favour of an endocrine function of the renal arterioles.
J. Path. Bact. 57: 392 (1945)

- 27 GROSS, F.
Experimentelle Grundlagen zur Pathophysiologie des Renin-Angiotensin-Systems.
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 74: 27 (1968)
- 28 GROSS, F., O. BUSCH, H. ZEUNG
Reduction of increased sensitivity to renin by cross circulation
Am J Physiol 202: 1095 (1962)
- 29 GROSS, F., G. SCHAECHTELIN, H. BRUNNER, G. PETERS
The role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and kidney function
Can Med Assoc J 90: 258 (1964)
- 30 HAAS, E.
Role of the renin system in experimental hypertension
In: Angiotensin System and Experimental Renal Disease
edited by J. Metcalf, Boston (1963) pp.: 53
- 31 HAAS, E., H. GOLDBLATT und E.C. GIPSON
Extraction, purification and acetylation of human renin and the production of antirenin to human renin.
Arch. Biochem. 110: 534 (1965)
- 32 HANAHAN, D.J., I. OLLEY
Chemical nature of monophosphoinositides
J. biol. Chem. 231: 813 (1958)
- 33 HANES, C.S., F.A. ISHERWOOD
Synthesis of peptides in enzymatic reaction involving glutathione
Nature 166:288 (1950)
- 34 HAYE, B., S. CHAMPION, C. JACQUEMIN
Control by TSH of a phospholipase A₂ activity, a limiting factor in the biosynthesis of prostaglandins in the thyroid
FEBS Letters 30: 253 (1973)
- 35 HEDQVIST, P.
Studies on the effect of prostaglandins E₁ and E₂ on the sympathetic neuromuscular transmission in some animal tissues
Acta Physiol Scand (Suppl) 345: 1 (1970)

- 36 HICKLER, R.B., D.P. LAULER, C.A. SARAVIS, G.W. THORN
Characterization of a vasodepressor lipid of the renal
medulla
Trans Ass Amer Physicians 77: 196 (1964)
- 37 HINMAN, J.W.
Prostaglandins
Annu Rev Biochem 41: 161 (1972)
- 38 HORTON, K.W., R.L. JONES
Prostaglandin A₁, A₂ and 19-hydroxy A₁: their additions
on smooth muscle and their inactivation on passage through
the pulmonary and hepatic portal vascular beds
Brit J Pharmacol 37: 705 (1969)
- 39 ITSKOVITZ, H.D., J. STEMPER, D. PACHOLCZYK, J.C. MC GIFF
Renal prostaglandins: Determinants of intrarenal distribution
of blood flow
Clin Sci Mol Med 45 (suppl. I): 321 (1973)
- 40 JANSZEN, F.H.A., D.H. NUGTEREN
Histochemical localisation of prostaglandin synthetase
Histochemie 27: 159 (1971)
- 41 KOTCHEN, T.A., M.C. MILLER
Effect of prostaglandins on renin reactivity
Am J Physiol 226 (2): 314 (1974)
- 42 KOLFF, W.J.
Reduction of experimental renal hypertension by kidney
perfusion.
Circulation 17: 702 (1958)
- 43 KUNZE, H., W. VOGT
Significance of phospholipase A for prostaglandin
formation
Ann NY Acad Sci 180: 123 (1971)
- 44 LANDS, W.E.M., B. SAMUELSSON
Phospholipid precursors of prostaglandins
Biochem Biophys Acta 164: 426 (1968)

- 45 LARAGH, J.H., M. ANGERS, W.G. KELLY und S. LIEBMAN
Hypotensive agents and pressor substances.
J. Am. Med. Assoc. 174: 234 (1960)
- 46 LARSSON, C., E. ÄNGGARD
Regional differences in the formation and metabolism
of prostaglandins in the rabbit kidney
Europ J Pharm 21: 30 (1973)
- 47 LARSSON, C.
Persönliche Mitteilung
- 48 LARSSON, C. and E. ÄNGGARD
Increased juxtamedullary blood flow on stimulation of intra-
renal prostaglandin biosynthesis
European J. Pharmacol. 25: 326 (1974)
- 49 LEE, J.B., K. CROWSHAW, B.H. TAKMAN, K.A. ATTREP,
J.Z. GOUGOUTAS
The identification of prostaglandins E₂, F_{2α} and A₂ from
rabbit kidney medulla
Biochem J 105: 1251 (1967)
- 50 LEE, J.B.
Cardiovascular-renal effects of prostaglandins
Arch Intern Med 133: 56 (1974)
- 51 LEE, J.B., J.Z. GOUGOUTAS, B.H. TAKMAN, E.G. DANIELS,
M.F. GROSTIC, J.E. PIKE, J.W. HINMAN, E.E. MUIRHEAD
Vasodepressor and antihypertensive prostaglandins of
PGE type with emphasis on the identification of
medullin as PGE₂-217
J Clin Invest 45: 1036 (1966)
- 52 LEE, J.B., R.B. HICKLER, C.A. SARAVIS, G.W. THORN
Sustained depressor effect of renal medullary extract
in the normotensive rat
Circ Res 13: 359 (1963)
- 53 LEE, J.B., B.G. COVINO, B.H. TAKMAN, E.R. SMITH
Renomedullary vasodepressor substance, medullin:
Isolation, chemical characterization and physiological
properties
Circ Res 17: 57 (1965)

- 54 LEE, J.B., M.A. MAZZEO, B.H. TAKMAN
The acidid lipid characteristics of sustained renomedullary
depressor activity
Clin Res 12: 254 (1964)
- 55 MARSCHNER, J., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDESDORFER,
B. POPP, C. RINGEL, P.C. SCRIBA
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels
Spline-Funktionen
Ärztli. Lab 20: 184 (1974)
- 56 MC GIFF, J.C., K. CROWSHAW, N.A. TERRAGNO, K.U. MALIK,
and A.J. LONIGRO
Differential effect of noredrenaline and renal nerve stimu-
lation on vascular resistance in the dog kidney and the
releese of a prostaglandin E-like substance.
Clin Sci 42: 223 (1972)
- 57 MC GIFF, J. C., N.A. TENAGRO, J.C. STRAND, J.B. LEE,
A.J. LONIGRO, K.K.F. NG
Selective passage of prostaglandins across the lung
Nature (London) 223: 742 (1969)
- 58 MC GIFF, J.C., H.D. ITSKOWITZ
Prostaglandins and the Kidney
Circ. Res. 33: 479 (1973)
- 59 MC GIFF, J.C., K. CROWHAW, N.A. TERRAGNO, A.J. LONIGRO
Release of a prostaglandin-like substance into renal
venous blood in response to angiotensin II
Circ. Res. 26, 27 (Suppl. I): 121 (1970)
- 60 MC MURRAY, W.C., W.L. MAGEE
Phospholipid metabolism
Annu Rev Biochem 41: 129 (1972)
- 61 MONTAGUE, D.
Kinetics of renin-angiotensinogen reaction in plasma
of normal and nephrectomized rats
Am J Physiol 215: 78 (1968)
- 62 MORGAN, T.E., D.O. TINKER, D.J. HANAHAN
Phospholipid metabolism in kidney. I. Isolation and identi-
fication of lipids of rabbit kidney
Arch Biochem Biophys 103: 54 (1963)

- 63 MUEHRCKE, R.C., MANDAL, A.K., VIOLINI, F.I.
Pathophysiological review of the renal medullary
interstitial cells and their relationship to
hypertension
Circ Res 27 (Suppl. I) I: 109 (1970)
- 64 MUIRHEAD, E.E. et al
The renal medulla as an antihypertensive organ
J Lab Clin Med 73: 641 (1970)
- 65 MUIRHEAD, E.E., G. GERMAIN, B.E. LEACH, J.A. PITCOCK,
P. STEPHENSON, B. BROOKS, W.L. BROSIUS, E.G. DANIELS,
J.W. HINMAN
Production of renomedullary prostaglandins by reno-
medullary interstitial cells grown in tissue culture
Circ Res (Suppl. II): 161 (1972)
- 66 MUIRHEAD, E.E., J.A. STIRMAN, W. LESCH, F. JONES
The reduction of postnephrectomy hypertension by
renal homotransplant
Surg Gyn Obst 103: 673 (1956)
- 67 MUIRHEAD, E.E., F. JONES, J.A. STIRMAN
Antihypertensive property in renoprival hypertension
of extract from renal medulla
J Lab Clin Med 56: 167 (1960)
- 68 MUIRHEAD, E.E., B.E. LEACH, G.B. BROWN, E.G. DANIELS,
J.W. HINMAN
Antihypertensive effect of prostaglandin E_2 in
renovascular hypertension
J Lab & Clin Med 70: 986 (1967)
- 69 MUIRHEAD, E.E., B.E. LEACH, L.B. BYERS, B. BROOKS,
E.G. DANIELS, J.W. HINMAN
Antihypertensive neutral renomedullary lipids (ANRL)
In: Kidney Hormones ed. by J.W. Fisher (1971)
pp: 485 - 506, Academic Press, New York
- 70 MUIRHEAD, E.E., B. BROOKS, W.A. FREYBURGER, J.W. HINMAN
Renomedullary antihypertensive principle in renal
hypertension
J Lab & Clin Med 67: 778 (1966)

- 71 MUIRHEAD, E.E., B. BROOKS
Antihypertensive action of renal medulla in salt-loading hypertension
Federation Proceedings 30: 431 (1971)
- 72 MUIRHEAD, E.E., B. BROOKS
Prevention of malignant hypertension of rabbit by renomedullary tissue
Federation Proceedings 29: 447 (1970)
- 73 MUIRHEAD, E.E., et al
Renomedullary vasodepression and antihypertensive function
Arch Pathol 80: 43 (1965)
- 74 MUIRHEAD, E.E., J.A. STIRMAN
Renal autoexplantation and protection against renoprivileged hypertensive cardiovascular disease and hemolysis
J Clin Invest 39: 266 (1960)
- 75 MUIRHEAD, E.E.
Protection against sodium overload hypertensive disease by renal tissue and medulloreneal extract
Arch Pathol 74: 214 (1962)
- 76 NEEDLEMAN, P., A.H. KAUFMANN, J.R. COUGLAS, E.M. JOHNSON
Specific stimulation and inhibition of renal prostaglandin release by angiotensin analogs
Am J Physiol 224 (1): 1415 (1973)
- 77 NG, K.K.F. und J.R. VANE
Conversion of angiotensin I to angiotensin II.
Nature 216: 762 (1967)
- 78 OSMOND, D.H., P.A. MCFADZEAN, L.J. ROSS
Plasma phospholipase A₂ activity in nephrectomized rats and the question of renin inhibition
Proc Soc Exp Biol Med 144: 969 (1973)
- 79 OSMOND, D.H., R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Quantitative studies of renin preinhibitor and total phospholipids in organs and in plasma and erythrocytes of control, nephrectomized, and very old rats
J Lab Clin Med 73: 795 (1969)

- 80 OSMOND, D.H., L.A. LEWIS, R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Renin "preinhibitor" in blood of anephric patients,
in a case of hypobetalipoproteinemia, and evidence
of its major association with plasma alpha lipoproteins
J Lab Clin Med 73: 809 (1969)
- 81 OSMOND, D.H.
Renal weight and content of lipids and phospholipid
renin "preinhibitor" in rats with renal hypertension
J Lab Clin Med 80: 755 (1972)
- 82 OSTROVSKY, D., S. SEN, R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Chemical assay of phospholipid renin preinhibitor in
canine and human blood
Circ Res 21: 497 (1967)
- 83 PAGE, I.H.
The production of persistent arterial hypertension by
cellophane perinephritis.
J. Amer. Med. Ass. 113: 2046 (1939)
- 84 PAGE, J.H., O.M. HELMER
Angiotensin activator, renin and angiotensin inhibitor,
and the mechanism of angiotensin tachyphylaxis in normal,
hypertensive and nephrectomized animals
J Exp Med 71: 495 (1940)
- 85 PLENTL, A.A., I.H. PAGE und W.W. DAVIS
The nature of renin activator.
J. Biol. Chem. 147: 143 (1943)
- 86 PFEIFFER, F.R., S.C. HOKE, C.K. MIAO, R.E. TEDESCHI,
J. PASTERNAK, R. HAHN, R.W. ERICKSON, H.W. LEVIN,
C.A. BURTON, J.A. WEISBACH
Lysophosphatidylethanolamine and 2-desoxy LPE derivatives
I. Potential renin inhibitors
J Med Chem 14: 493 (1971)
- 87 POULSEN, K.
Kinetics of the renin system: The basis of the determination
of the different components of the system
University of Copenhagen, Denmark 1973

- 88 RAKHIT, S.
On the structure of the renin inhibitor from hog kidney
Can J Biochem 49: 1012 (1971)
- 89 ROUSER, G., J. O'BRIEN, D. HELLER
Separation of phosphatidyl ethanolamin and phosphatidyl ser
J. Am. Oil. Chem. Soc. 38:14 (1961)
- 90 SAMBHI, M.P., C.E. WIEDMAN
In vitro influence of prostaglandins on angiotensin generation by human renin
Clin. Res. 18: 124 (1970)
- 91 SELYE, H.
Production of nephrosclerosis by overdosage with desoxycorticosterone acetate.
Canad. Med. Ass. J. 47: 515 (1942)
- 92 SEN, S., R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Isolation of a phospholipid renin inhibitor from kidney
Biochemistry 6: 1572 (1967)
- 93 SEN, S., R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Antihypertensive effect of a isolated phospholipid
Am J Physiol 214 (2): 337 (1968)
- 94 SEN, S., R.R. SMEBY, F.M. BUMPUS
Plasma renin activity in hypertensive rats after treatment with renin preinhibitor
Am J Physiol 216: 499 (1969)
- 95 SHELTAWY, A., R.M.C. DAWSON
Separation and estimation of phospholipids
In: Smith, J. (Ed.): Chromatographic and electrophoretic techniques S. 450
William Heinemann Medical / Books LTD (1969)
- 96 SKEGGS, L.T., K.E. LENTZ, H. HOCHSTRASSER und J.R. KAHN
The chemistry of renin substrate.
Canad. Med. Ass. J. 90: 185 (1964)

- 97 SKIDMORE, W.D., C. ENTENMAN
2-dimensional thin-layer chromatography of rat liver phosphatides
J. Lipid Res. 3: 471 (1962)
- 98 SMEBY, R.R., S. SEN, F.M. BUMPUS
A naturally occurring renin inhibitor
Circ Res (suppl. II): 129 (1967)
- 99 SMEBY, R.R., F.M. BUMPUS
Renin Inhibitors
In: Kidney Hormones
ed. by J.W. Fisher Academic Press, New York (1971)
- 100 SMITH, R.H.
The phosphatides of the latex of *Hevea brasiliensis*
Biochem. J. 57: 130 (1954)
- 101 TIGERSTEDT, R., P.G. BERGMANN
Niere und Kreislauf
Scand Arch Physiol 8: 223 (1898)
- 102 TINKER, D.O., D.H. OSMOND, H.J. SCHWARTZ, L.J. ROSS
Dog kidney phospholipids and the question of
renin inhibition
Can J Biochem 51: 863 (1973)
- 103 TOBIAN, L., M. ISHII and M. DUKE
Relationship of cytoplasmic granules in renal papillary
interstitial cells to "post-salt" hypertension.
J Lab Clin Med 73: 309 (1969)
- 104 TURCOTTE, J.G., R.E. BOYD, J.G. QUINN, R.R. SMEBY
Isolation and renin-inhibitory activity of phospho-
glyceride from shark kidney
Med Chem 16: 166 (1973)
- 105 WEBER, P.
Zur Bestimmung von Mikroreninaktivitäten im menschlichen
Gewebe
Ludwig-Maximilians-Universität, München 1972

- 106 WEBER, P., E. HELD, E. UHLICH, J. EIGLER
Reaction constants of renin in juxtaglomerular
apparatus and plasma renin activity after renal
ischemia and hemorrhage
Kidney Int 7: 331 (1975)
- 107 WEBER, P., J. BAUER, E. UHLICH, J. EIGLER, E. HELD
Reaction constants and concentration of renin in
kidney tissue, renal vein and peripheral plasma in
human renovascular hypertension
VI. International Congress of Nephrology Firenze 1975
- 108 WEBER, P.C., C. LARSSON, E. ÄNGGARD, M. HAMBERG, E.J.
COREY, K.C. NICOLAOU and B. SAMUELSSON
Stimulation of renin release from rabbit renal cortex
by arachidonic acid and prostaglandin endoperoxides.
Circ Res 39, No. 6, in press
- 109 WEBER, P.C., J. BAUER, E. UHLICH, E. HELD and F.
SCHILDBERG
Kidney and plasma renin in human renovascular hyperten-
sion
European J Clin Invest 6: 415 (1976)
- 110 YEUNG, S.K.F., A. KUKSIS
Molecular species of ethenolamin-phosphatides of
dog and pig kidney
Can J Biochem 52: 830 (1974)
- 111 ZACHARIAH, N.Y., R.R. SMEBY, S. SEN, F.M. BUMPUS,
C. SINGH
Phospholipase A₂ in experimental hypertension
Am J Physiol 228 (6): 1782 (1975)
- 112 ZINS, G.R.
Renal prostaglandins
Am J Med 58: 14 (1975)

Herrn Priv.-Doz.Dr.med.E.Held und Herrn Dr.med. P.Weber
danke ich für die Überlassung des Themas und für ihre
stetige und hilfreiche Anleitung und Unterstützung

Lebenslauf

Am 31. Juli 1948 wurde ich in München als Sohn des Rechtsreferendars Robert Kohl und seiner Ehefrau Rosa, geb. Weber, geboren. Hier wuchs ich bis 1953 auf, unsere Familie zog dann nach Landshut. Dort besuchte ich vier Jahre die Volksschule, dann das Humanistische Hans Carossa Gymnasium, an dem ich 1967 auch das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilian Universität München. Im Sommer 1973 legte ich hier das Medizinische Staatsexamen ab. Im Anschluß arbeitete ich in der II. Medizinischen Klinik der Universität zunächst als Doktorand, dann als Medizinalassistent. Die Approbation als Arzt erhielt ich 1975. Vom September 1975 an bin ich in der Nervenlinik der Universität München beschäftigt, zunächst als Zivildienstleistender, seit Januar 1977 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle

Seit März 1974 bin ich mit meiner Frau Gertrud, geb. Eckert, verheiratet.

